



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JUCILENE FREITAS DOS SANTOS

EFEITO CARDIOPROTETOR DO TIMOL EM CORAÇÕES DE RATOS
SUBMETIDOS À LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Aracaju

2016

<p>JUCILENE FREITAS DOS SANTOS</p>	<p>EFEITO CARDIOPROTECTOR DO TIMOL EM CORAÇÕES DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO</p> <p>2016</p>

JUCILENE FREITAS DOS SANTOS

**EFEITO CARDIOPROTETOR DO TIMOL EM CORAÇÕES DE RATOS
SUBMETIDOS À LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Lauton Santos

Aracaju

2016

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S231e Santos, Jucilene Freitas dos
Efeito cardioprotetor do timol em corações de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão / Jucilene Freitas dos Santos; orientadora Sandra Lauton Santos. – Aracaju, 2016.
75 f.: il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Isquemia Miocárdica. 2. Antioxidantes. 3. Timol. I. Santos, Sandra Lauton, orient. II. Título.

CDU 612.17

EFEITO CARDIOPROTETOR DO TIMOL EM CORAÇÕES DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Aprovada em: 29/02/2016

1ª Examinadora: Profª. Drª. Adriana Andrade Carvalho

PARECER

[illegible]

AGRADECIMENTOS

À Deus, autor da minha vida, por ter me dado forças para concluir esta importante etapa.

Aos meus pais Erotildes Freitas e José Domingos, pelo exemplo de vida, pela dedicação constante aos filhos e pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza. Sei que nunca mediram esforços em me ajudar. À meus irmãos Jeane, Janice e Roberto pelo apoio e carinho, e também pelo incentivo para que eu iniciasse e concluísse o mestrado.

A toda minha família pelo amor, incentivo, compreensão e alegria.

Aos amigos, que também fazem parte da minha família, pelo incentivo, lealdade, amizade e dedicação: Thueyse, Heitor, Karina Sato, Evaldo e Mayara Tavares.

Aos meus amigos: Pedro Gomes, Jéssica Aline, Couto, Thássio, Jadson, Aline e Braulio que acreditaram em mim e que, mesmo de longe, demonstraram tanto carinho apoiando os meus sonhos.

A minha orientadora Sandra Lauton Santos, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, pela contribuição dada à minha formação, pela confiança neste trabalho e pela amizade.

À equipe do Laboratório de Biologia Cardiovascular e Estresse Oxidativo: Marden Mendes, Grace Kelly, Péligres Henrique, Rodrigo Miguel, Lucas Sá, Francielle Feitosa, Raquel Britto, Iolanda, Tamires e Maraísa, pela ajuda que me foi dada durante o mestrado e pela amizade. Sem vocês não teria conseguido.

À Silvan do Laboratório de Bioquímica pelo apoio e colaboração no trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

À Capes, pelo recurso financeiro.

À Universidade Federal de Sergipe, onde conclui minha graduação e agora o mestrado.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção.

Àqueles que contribuíram para que esse sonho se concretizasse, muito obrigada!

“And now the end is near, And so I face the final curtain, My friend, I'll say it clear, I'll state my case, of which I'm certain...I planned each chartered course, Each careful step along the by way, And more, much more than this, I did it my way...” (My way - Paul Anka / Jacques Reveaux / Claude François)

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser... mas, graças a Deus, não somos o que éramos. ” (Martin Luther King)

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio ocorre quando há diminuição do suprimento sanguíneo no miocárdio promovendo queda do aporte de Oxigênio (O_2). É uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A lesão tecidual ocorre, em sua maior parte, paradoxalmente, durante a reperfusão do órgão. Na reoxigenação, há exacerbada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e sobrecarga de cálcio intracelular, que desencadeiam a morte celular. Poucas são as estratégias de intervenção farmacológica para a prevenção e limitação destas lesões. E, além disso, as formas disponíveis de intervenção não são totalmente eficazes. Recentemente, tem-se direcionado as atenções para os efeitos de produtos naturais na limitação dos danos provocados pela lesão de isquemia e reperfusão (I/R). Neste contexto, o timol, um monoterpene fenólico, possui, dentre as suas atividades biológicas, ação antiinflamatória e antioxidante. Neste sentido, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial efeito cardioprotetor do timol na prevenção da lesão de reperfusão pós-isquemia em ratos. Primeiramente foi realizado o ensaio de sequestros de radicais DPPH pelo timol. Para estudar seu potencial cardioprotetor, foram utilizados ratos Wistar machos (200-300 g) pré-tratados com timol (7,5 mg/kg, v.o.) ou veículo por 7 dias e submetidos a isquemia global do coração em sistema Langendorff. Foram avaliados parâmetros da função cardíaca como pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PVDE), derivada temporal máxima (+Dp/dt) e mínima (-dp/dt) e índice de severidade da arritmia (ISA), tamanho da área de infarto, além de ensaios de atividade enzimática da catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), glutationalas peroxidase (GPx) e redutase (GR), quantificação tecidual de sulfidrilas, bem como a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e hidroperóxidos de lipídeos. O ensaio de DPPH demonstrou propriedade antioxidante do timol. Além disso, foi observado que o pré-tratamento com timol preservou a PDVE, diminuiu o ISA, reduziu a área de infarto, TBARS e, de modo similar, foi observada menor concentração de hidroperóxidos quando comparado ao veículo. O pré-tratamento com timol preveniu a redução da concentração de grupamentos sulfidrilas quando comparado ao veículo. As atividades das enzimas SOD, CAT, GPx e GR foram reduzidas de maneira significativa em corações de animais pré-tratados com timol quando comparados ao veículo.

O pré-tratamento com timol preservou a função contrátil e cardíaca, reduziu danos aos componentes celulares e limitou a área de infarto. Demonstrando significativos efeitos cardioprotetores contra I/R.

Descritores: Isquemia Miocárdica, Efeito Antioxidante, Testes de Função Cardíaca, Timol.

ABSTRACT

Acute myocardial infarction occurs when there is reduced blood supply to the myocardium promoting decrease of oxygen uptake (O_2). It is a major cause of morbidity and mortality worldwide. Tissue injury occurs, for the most part, paradoxically, during reperfusion of the organ. In reoxygenation, there are exacerbated production of reactive oxygen species (ROS) and intracellular calcium overload, which trigger cell death. There are few pharmacological intervention strategies for the prevention and limitation of these lesions. And besides, the available forms of action are not entirely effective. Recently, it has directed attention to the effects of natural products in limiting the damage caused by ischemia and reperfusion (I/R). In this context, thymol, a phenolic monoterpene, has, among its biological activities, anti-inflammatory and antioxidant. In this sense, the objective of the study was to evaluate the potential cardioprotective effect of thymol in preventing reperfusion injury after ischemia in rats. First it performed the test clearance of radical DPPH by thymol. To study its potential cardioprotective, rats Wistar rats (200-300 g) pretreated with thymol (7.5 mg/kg, v.o.) or vehicle for 7 days and subjected to global ischemia of the heart in the Langendorff system. We evaluated parameters of cardiac function as left ventricle developed pressure (LVDP), maximum time derivative (+ dp/dt) and minimum (-dp/dt) and arrhythmia severity index (ASI), size of the infarcted area, and enzymatic activity assays catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and reductase (GR), tissue sulfhydryl quantification. Moreover, the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and lipid hydroperoxides evaluated too. The DPPH assay showed antioxidant property of thymol. Furthermore, it was observed that pretreatment with thymol preserved LVDP, ASI decreased, reduced infarct area, the TBARS and, similarly, was observed lower concentration of hydroperoxides as compared to vehicle. Pretreatment with thymol prevented to reduce the concentration of sulfhydryl groups when compared to vehicle. The activities of SOD, CAT, GPx and GR were reduced significantly in the hearts of animals pretreated with thymol when compared to vehicle.

Pretreatment with thymol preserved contractile heart function, reduced damage to cellular components and limited the infarct area. Demonstrating significant cardioprotective effects against I/R.

Keywords: Myocardial Ischemia, Antioxidants, Heart Function tests, thymol.

SIGLAS E ABREVIACÕES

ADP - Adenosina Difosfato

AMI - Albumina Modificada pela Isquemia

ATP - Adenosina Trifosfato

BNP - Peptídeo Natriurético tipo B

CAT - Catalase

C-ANF - Fator Natriurético Atrial tipo C

CK - Creatina Quinase

CNP - Peptídeo Natriurético tipo C

CO₂ - Dióxido de Carbono

cTn - Troponina C

cTnI - Troponina Cardíaca I

CXCL2 - Quimiocina Ligante 2

DMSO - Dimetilsulfóxido

+dP/dt - Derivada Temporal de Pressão Ventricular Máxima

-dp/dt - Derivada Temporal de Pressão Ventricular Mínima

DPP4 - Dipeptidil Peptidase-4

DPPH - 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil

ECG - Eletrocardiograma

eNOS - Óxido Nítrico Sintase Endotelial

ERNs - Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FADH₂ - Dinucleotídeo de Flavina e Adenina

FC - Frequência Cardíaca

γ-GCS - γ-Glutamil Cisteína Sintase

GCL - Glutamato Cisteína Ligase

GMPc - Monofosfato Cíclico de Guanosina

GPx - Glutathione Peroxidase

GR - Glutathione Redutase

GSH - Glutathione

GSH Sintase - Glutathione Sintase

H₂O - Água

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HOCl - Ácido Hipocloroso

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzida

I/R - Isquemia-Reperfusão

ISA - Índice de Severidade de Arritmia

K_{ATP} - Canais para K⁺ Sensíveis a ATP

K_{Ca} - Canais para K⁺ Ativados por Ca²⁺

LAC - Ligadura da Artéria Coronária

LOO⁻ - Radicais Peroxila

MDA - Malondialdeído

mitoK_{Ca} - Canais Mitocondriais de Canais para K⁺ Ativados por Ca²⁺

mitoK_{ATP} - Canais Mitocondriais de K⁺ Sensíveis a ATP

MPO - Mieloperoxidase

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida

NADH Desidrogenase - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Ligada com Hidrogênio

NADPH Oxidase - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase

NCX - Trocador Na⁺/Ca²⁺

nNOS - Óxido Nítrico Sintase Neuronal

NO - Óxido Nítrico

NOS - Óxido Nítrico Sintase

¹O₂ - Oxigênio Singlet

O₂⁻ - Ânion Superóxido

OH⁻ - Radical Hidroxila

ONOO⁻ - Peroxinitrito

ONOOH - Ácido Peroxinitroso

PTPM - Poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial

RS - Retículo Sarcoplasmático

RyR - Receptores de Rianodina

SERCA - Ca²⁺ ATPase do Retículo Sarcoplasmático

SOD - Superóxido Dismutase

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TTC - Cloreto de Trifeniltetrazólio

XO - Xantina Oxidase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Solução de Krebs	45
Tabela 2. Determinação do Índice de Severidade de Arritmia (ISA).....	46
Tabela 3. Constituintes dos Tampões Utilizados na Preparação dos Tecidos Cardíacos para os Ensaios Bioquímicos	47

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mudanças metabólicas e bioquímicas em resposta a isquemia e reperfusão.....	24
Figura 2. Principais mecanismos da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondrial.....	29
Figura 3. Principais mecanismos da geração de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (ERO).	31
Figura 4. Reação de Fenton e de Haber-Weiss.	32
Figura 5. Estrutura molecular do timol.....	39
Figura 6. Delineamento experimental.	44
Figura 7. Representação esquemática do sistema de perfusão de coração isolado Langendorff.	45
Figura 8. Representação esquemática do protocolo experimental.	46
Figura 9. Sequestro de radicais DPPH pelo timol em diferentes concentrações (50, 70, 90, 110 e 130 µg/mL).	51
Figura 10. Parâmetros da função contrátil cardíaca avaliados em coração isolado de animais pré-tratados durante 7 dias com timol (7,5 mg/Kg/dia - v.o.)	52
Figura 11. Parâmetros da função contrátil cardíaca avaliados em coração isolado de animais pré-tratados durante 7 dias com timol (7,5 mg/Kg/dia - v.o.) e submetidos ou não à lesão de reperfusão pós-isquemia.	53
Figura 12. Índice de Severidade de Arritmias (ISA) medido em coração isolado de animais pré-tratados durante 7 dias com timol (7,5 mg/Kg/dia - v.o.) e submetidos à lesão de reperfusão pós-isquemia.	54
Figura 13. Imagens representativas de secções transversais do coração de ratos pré-tratados durante 7 dias e submetidos à lesão de isquemia e reperfusão.	54

Figura 14. Área de infarto em corações de ratos pré-tratados com timol (7,5 mg/Kg/dia - v.o.) ou veículo e submetidos à lesão de isquemia e reperfusão.....	55
Figura 15. Atividades das enzimas antioxidantes (A) superóxido dismutase (SOD), (B) catalase (CAT), (C) glutathione peroxidase (GPx) e (D) glutathione reductase (GR) em corações de ratos pré-tratados com o timol e submetidos ou não a lesão de reperfusão pós-isquemia. .	56
Figura 16. Peroxidação lipídica em corações de animais pré-tratados com timol (7,5 mg/Kg/dia - v.o.) e submetidos a lesão de reperfusão pós-isquemia.	57
Figura 17. Concentração de grupamentos sulfidríla em corações de animais pré-tratados com timol (7,5 mg/Kg/dia - v.o.) e submetidos a lesão de reperfusão pós-isquemia.....	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1. INTERRUPÇÃO DO FLUXO SANGUÍNEO NO INFARTO DO MIOCÁRDIO E EM PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	19
2.2. MECANISMOS DA LESÃO DE REPERFUSÃO PÓS-ISQUEMIA.....	22
2.2.1. POSSÍVEIS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA AS LESÕES DE REPERFUSÃO.....	25
2.3. ESTRESSE OXIDATIVO	27
2.4. PRODUTOS NATURAIS	36
2.4.1. TERPENOS	36
2.4.2. TIMOL	37
3. OBJETIVOS.....	42
GERAL.....	42
ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA:	43
4.2. SEQUESTRO DE RADICAL LIVRE 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)	43
4.3. ANIMAIS, TRATAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS	43
4.4. MODELO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO E DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDÍACOS.....	44
4.5. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SEVERIDADE DE ARRITMIAS (ISA).....	46
4.6. DETERMINAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO	47
4.8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS.....	48
4.9. ENSAIOS ENZIMÁTICOS	48
4.9.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE	48
4.9.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE	48
4.9.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE	49
4.9.4. GLUTATIONA REDUTASE	49
4.10. TBARS	49
4.11. MENSURAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS TOTAIS	50
4.12. MEDIDA DE GRUPAMENTOS SULFIDRILA	50
4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5. RESULTADOS	51
5.1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO TIMOL.....	51
5.2. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDÍACOS.....	51
5.3. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SEVERIDADE DE ARRITMIA (ISA).....	53
5.4. DETERMINAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO	54
5.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	55

5.6. DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	56
5.7. MENSURAÇÃO DE GRUPAMENTOS SULFIDRILA NAS PROTEÍNAS	57
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÃO, SUGESTÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

A isquemia é a falta ou interrupção de suprimento sanguíneo para um órgão, devido a obstrução da vasculatura. O sangue, através das hemácias, leva oxigênio às células, portanto uma isquemia desencadeia uma hipóxia. E isso contribui para a fisiopatologia de situações clínicas como, por exemplo, infarto agudo do miocárdio (IAM), insuficiência vascular periférica e choque hipovolêmico (DE CASTRO E SILVA JR. et al., 2002).

O reestabelecimento do fluxo sanguíneo, denominado reperfusão, pode prevenir lesão miocárdica por isquemia e reduzir tamanho do infarto, sendo este um objetivo terapêutico (MINAMINO, 2012). Porém, a reoxigenação miocárdica provoca várias alterações subcelulares, as quais, geram lesões de reperfusão, representadas clinicamente por arritmias ventriculares e até mesmo por morte celular (RUIXING; WENWU; AL-GHAZALI, 2007). Devido a sua complexidade, a doença isquêmica do coração ainda é um dos problemas de saúde mais prevalentes no mundo, e uma das principais causas de morbidade e mortalidade (SOLER E RUIZ, 2010) e ainda está aumentando com uma vasta ascensão mundial a um estilo de vida de baixa qualidade.

Para encontrar tratamentos eficazes para a prevenção e cura de doenças do coração, é importante compreender os mecanismos subjacentes a causa e o desenvolvimento da doença. Crescentes evidências têm mostrado que a sobrecarga intracelular de Ca^{2+} , as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) desempenham papéis importantes na iniciação e progressão da lesão de isquemia e reperfusão (I/R) (SEIDLMAYER et al., 2015). Embora várias manobras venham sendo utilizadas na clínica para contornar ou prevenir a lesão de reperfusão, nenhuma delas apresentam um efeito satisfatório. A utilização de antioxidantes, especialmente os antioxidantes naturais, na prevenção e cura de doenças tem atraído um interesse enorme pois, os mesmos podem intervir e ajudar na limitação das lesões de reperfusão (ZHAO E ZHAO, 2010).

O timol é um monoterpeneo fenol dietético que é encontrado em óleos de plantas tais como tomilho, *Thymus vulgaris*, *Timbra spicata*, *Thymus ciliados*, e como orégano, *Trachyspermum ammi* vulgarmente conhecido como ajwain no subcontinente indiano, *Monarda fistulosa* e sementes de *Nigella sativa* (BASCH et al., 2004; QUIROGA; ASENSIO; NEPOTE, 2015). Há evidências de que o timol possui várias atividades biológicas importantes, tais como, antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, radioprotetora, vasorrelaxante e antioxidante (MEERAN; SELVARAJ; JAGADEESH, 2014; NAGOOR

MEERAN; JAGADEESH; SELVARAJ, 2015b; SANTOS et al., 2011b; YODIM E DEANS, 1999).

O estado de saúde cardiovascular da população melhorou substancialmente devido a uma melhora da qualidade de vida. Além disso, o prognóstico e sobrevida de pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio melhoraram por causa da introdução de agentes trombolíticos, das unidades coronarianas, da cardiologia invasiva e cirurgia cardíaca. Ainda assim, estamos distantes da situação ideal. Sabe-se que, atualmente, as doenças isquêmicas ainda são as principais causas de morbimortalidade em todo o mundo.

As lesões causadas pela interrupção do fluxo seguido de reperfusão acarretam em alterações sérias ao paciente, incluindo arritmias e atordoamento do miocárdio. Fazendo com que o mesmo retorne num curto intervalo de tempo aos cuidados médicos ou até mesmo o levando a morte.

Atualmente não existem medicamentos que possam ser utilizados como intervenção prévia ou durante a interrupção do fluxo limitando as lesões de reperfusão. E as alternativas que estão sendo investigadas ainda são um protótipo.

A cooperação entre a pesquisa pré-clínica e clínica foram essenciais para todas as intervenções que existem até hoje. Mas, ainda é necessário avançar nesse sentido e assim progredir na melhora clínica desses pacientes. Existe, portanto, uma necessidade urgente de formas eficazes de prevenção para limitar as lesões. E as propriedades do timol, tais como potencial antioxidante, fazem desta substância uma forte candidata na prevenção e ou tratamento de danos e patologias cardíacas causadas por estresse oxidativo.

Neste trabalho estudamos, em um modelo de isquemia e reperfusão (I/R) global *ex vivo*, efeito cardioprotetor do timol, antioxidante natural, contra a lesão de I/R.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. INTERRUPTÃO DO FLUXO SANGUÍNEO NO INFARTO DO MIOCÁRDIO E EM PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é definido como a morte de cardiomiócitos devido a uma isquemia prolongada resultante de um desequilíbrio entre a demanda e a oferta de O₂ (ALPERT et al., 2000). O IAM continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (SOLER E RUIZ, 2010), e conforme previsões, sua incidência aumentará de forma alarmante devido a rápida urbanização, sedentarismo, hábitos alimentares alterados e ao aumento do estresse cotidianos das pessoas. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a doença isquêmica cardíaca será a principal causa mundial de morte no ano de 2020 (MURRAY E LOPEZ, 1997; OSTADAL, 2009).

Normalmente, a isquemia cardíaca ocorre quando o suprimento sanguíneo coronariano para o miocárdio é interrompido devido à obstrução da vasculatura, levando a um menor aporte de O₂. Uma das causas de interrupção no fornecimento de O₂ advém da formação de um trombo, da presença de placa aterosclerótica que resulta em oclusão da coronária ou quando há uma obstrução dinâmica associada com vasoespasmo coronariano. Tudo isso prejudica os mecanismos de reparação celular miocárdica que mantém função normal do miocárdio e homeostase. Como as hemácias presentes no sangue levam o oxigênio às células, a isquemia dá origem à hipóxia e contribui para a fisiopatologia das lesões provocadas pelo IAM, insuficiência vascular periférica e choque hipovolêmico (CENTURION et al., 2002).

A isquemia pode ocorrer silenciosamente e alguns indivíduos não sentem sinais ou sintomas. Quando há presença de sinais e sintomas, o mais comum é a dor ou pressão no peito, tipicamente no lado esquerdo (angina do peito). Outros sinais e sintomas que podem ser apresentados mais comumente por mulheres, idosos e pessoas com diabetes incluem dor no pescoço ou mandíbula, dor no ombro ou braço, aumento de frequência cardíaca (FC), dispneia quando em atividade, náusea e vômito, suor e fadiga (MAYO CLINIC, 2015).

Além de a angina ser o sintoma mais comum é ainda a causa cardiovascular mais corriqueira de internação hospitalar, estando envolvida também na maioria das internações em unidades coronarianas. Quando o paciente desenvolve elevações nos marcadores bioquímicos de dano miocárdico, pode-se dizer que ocorreu IAM, mas sem supra desnivelamento do segmento ST, que é um importante indicador de mau prognóstico encontrado no

eletrocardiograma (ECG). Como determinantes de pior prognóstico estão a idade ≥ 65 anos, elevação de marcadores bioquímicos, depressão do segmento ST $\geq 0,5$ mm (que é uma obstrução grave, mas, parcial de alguma artéria coronária), uso de ácido acetilsalicílico nos últimos 7 dias, presença de 3 ou mais fatores de risco tradicionais para doença arterial coronariana (hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes melitus, tabagismo, histórico familiar) e angina grave recente (< 24 horas) (NICOLAU et al., 2014).

Já a identificação de IAM com supra desnivelamento do segmento ST caracteriza situação clínica de extrema gravidade e com risco de morte, determinada por oclusão total de uma artéria coronária epicárdica. No IAM com elevação do segmento ST há indicação de intervenção coronária percutânea e este procedimento quando realizado em até 2 horas após o infarto tem apresentado resultados satisfatórios. É importante que haja centros especializados com uma equipe qualificada, além da brevidade do atendimento ao paciente (HEIJINK et al., 2015). Essa ultima informação nos faz refletir que além de complicações próprias da fisiopatologia há ainda outras condições como, por exemplo, a problemática no ambiente hospitalar. Isto pode interferir no tratamento, se houver retardo para o uso das terapias de reperfusão nos pacientes, isso provocará lesões mais impactantes.

Vários eventos isquêmicos independentes ou a ocorrência de isquemia por um período prolongado pode resultar em dano celular irreversível do miocárdio ou morte celular (SUNMONU E AFOLAYAN, 2010). Se o período de isquemia miocárdica for prolongado (mais de 20 minutos) uma "frente de onda" da morte de cardiomiócitos começa no subendocárdio e estende-se ao longo do tempo transmuralmente para o epicárdio (REIMER et al., 1977). Porém, estudos experimentais sugerem que a reperfusão de áreas isquêmicas pode ser benéfica protegendo células miocárdicas em risco, mas, também desencadeiam mudanças estruturais que se agravam nesta fase e, por isso, o dano celular induzido é denominado de lesão de isquemia e reperfusão (I/R), que ocorre mesmo quando a reperfusão é precoce (CARDEN E GRANGER, 2000).

Clinicamente uma das formas de diagnósticos da ocorrência de isquemia é através da quantificação de marcadores séricos de necrose cardíaca tais como creatina quinase (CK), troponina c (cTn) ou mioglobina que, em altas concentrações, demonstram lesão. Os pacientes que possuem suspeita de síndrome aguda coronariana são rotineiramente submetidos a avaliação clínica, eletrocardiograma de 12 derivações, e mensurações de cTn, a fim de identificar diretamente e quantificar lesão em cardiomiócitos. Quando há o diagnóstico é recomendado a terapia de reperfusão primária (HAAF et al., 2014). Albumina modificada pela isquemia (AMI) é o mais novo marcador para avaliar pacientes com isquemia cardíaca.

Apesar de ainda não ser usual clinicamente, este marcador pode ser útil para a triagem de pacientes que apresentam angina. Esta albumina também está aumentada em uma pequena proporção de pacientes com sintomas de acidente vascular cerebral, o que sugere que ela deve ser considerada um marcador de eventos isquêmicos agudos e não específico para isquemia cardíaca (TALWALKAR et al., 2008). Além disso, a constatação da síndrome coronariana aguda está associada a hiperglicemia e a eventos cardiovasculares adversos em pacientes diabéticos e não diabéticos. É importante destacar a necessidade de se avaliar a concentração de glicose no sangue na admissão de todos os pacientes internados por síndrome coronariana aguda, incluindo os não diabéticos, com o objetivo de identificar aqueles com maior risco de complicações (PINHEIRO et al., 2013).

A reperfusão compreende a restauração do fluxo sanguíneo com o consequente restabelecimento das condições normóxicas após um período de hipóxia ou isquemia. A terapia de reperfusão é conduta prioritária no tratamento do IAM nas primeiras 12 horas de evolução. Pode ser realizada por intervenção coronária percutânea ou através de terapia trombolítica (com uso de agentes fibrinolíticos - estreptoquinase) (ANDREENKO E BESSOLITSINA, 1977; NICOLAU et al., 2014). Essa restauração do fluxo sanguíneo produz aceleração das mudanças estruturais que se associam à morte celular (RUIXING; WENWU; AL-GHAZALI, 2007). Existem diferentes hipóteses em relação aos danos ocasionados pela reperfusão, sendo as principais o aumento brusco na oferta de O_2 e na concentração intracelular de Ca^{2+} (PIPER; GARCÍA-DORADO; OVIZE, 1998).

Existem algumas alternativas farmacológicas para conduta com os pacientes nas quais se inclui a administração de (1) aspirina, para redução de coágulos sanguíneos, o que pode ajudar a prevenir a obstrução de artérias coronárias, porém se deve ter cautela com distúrbios hemorrágicos; (2) nitratos, que mantém vasodilatação temporária em artérias, melhorando o fluxo sanguíneo; (3) bloqueadores β -adrenérgicos, que causam inotropismo negativo diminuem a FC e a pressão arterial; (4) bloqueadores dos canais para Ca^{2+} , que provocam inotropismo negativo e vasorrelaxamento, aumentando o fluxo sanguíneo; (5) medicamentos para diminuir o colesterol; (6) inibidores da enzima conversora de angiotensina, que promovem vasorrelaxamento e diminuição da pressão arterial; (7) ranolazina (Ranexa), medicamento utilizado para aliviar a angina aprovado pela FDA em 2007; (8) Dicloridrato de trimetazidina, aprovado pela INFARMED em 2014 para tratamento de cardiopatia isquêmica.

Outros tipos de intervenções incluem os procedimentos para melhorar o fluxo sanguíneo como a angioplastia e implante de *stent*, cirurgia de revascularização miocárdica e contrapulsção externa aumentada (MAYO CLINIC, 2015).

A isquemia seguida de reperfusão também pode ocorrer em procedimentos cirúrgicos, neste caso, vários fatores determinam a dimensão dos danos causados ao tecido, como por exemplo, duração do procedimento cirúrgico, tempo de circulação extracorpórea, anestésicos e drogas vasoativas utilizadas.

O número de cirurgias cardíacas de grande porte com necessidade de circulação extracorpórea tem aumentado continuamente, e é neste sentido em que as observações a respeito das mudanças decorrentes da reperfusão foram direcionadas. Em pacientes submetidos a tais cirurgias o risco de morbimortalidade é aumentado. Foi observado que na cirurgia de revascularização miocárdica há presença de várias disfunções cardíacas que ocorre após o restabelecimento da circulação coronariana (LERCH, 1993; MAXWELL E LIP, 1997). As alterações decorrentes da reperfusão são clinicamente representadas de várias maneiras: (1) arritmias, com a reoxigenação miocárdica, onde frequentemente se tem a presença de arritmias graves como taquicardia e fibrilação ventricular; (2) atordoamento do miocárdio ou lesão funcional, fenômeno caracterizado por uma disfunção do miócito que irá se recuperar em alguns dias ou horas; (3) lesão letal, consiste da morte celular como consequência da reperfusão (BRASILEIRO, 1997). O risco decorrente destas disfunções pode ser atribuído, em parte, à falta de intervenções prévias ou durante o procedimento que possam proteger o miocárdio e a susceptibilidade a lesão de isquemia e reperfusão. Por isso, o desenvolvimento de intervenções protetoras em cirurgia cardíaca continua a ser importante (KURAPEEV et al., 2015).

2.2. MECANISMOS DA LESÃO DE REPERFUSÃO PÓS-ISQUEMIA

Em 1895, Oskar Langendorff publicou um artigo científico onde descreveu pela primeira vez o modelo de estudo experimental de coração isolado, que desde então tem sido amplamente utilizado nas áreas de farmacologia, cardiologia e cirurgia cardíaca para estudar a função e a fisiologia do coração. Esse modelo, juntamente com os avanços na área da bioquímica facilitaram a compreensão e elucidação de vários mecanismos acerca da lesão de reperfusão (HILL et al., 2005).

As lesões de reperfusão são relacionadas a privação do aporte sanguíneo por alguns fatores. Dentre eles, podemos primeiramente destacar a redução da adenosina trifosfato (ATP) e a síntese e acúmulo de produtos metabólicos. As mitocôndrias são alvos importantes dos danos provocados pelos processos de I/R. Nelas ocorrem diminuição das atividades da NADH

desidrogenase (nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada com hidrogênio desidrogenase), do carreador de ADP/ATP (adenosina difosfato/adenosina trifosfato) e da ATP sintetase, além do aumento na atividade da fosfolipase A₂. O ATP e o fosfato de creatina são produtos energéticos dos quais 85% estão comprometidos com a contração cardíaca e os 15% restantes são utilizados pelos sistemas de transportes e síntese de proteínas (MONASSIER, 2008).

Assim, na ausência de O₂, há uma mudança para o processo metabólico celular de respiração anaeróbica, resultando na produção de lactato e queda no pH intracelular (Figura 1). Isto induz o trocador Na⁺/H⁺ a transportar o H⁺ intracelular para fora resultando em sobrecarga de Na⁺, que ativa o trocador 2Na⁺/Ca²⁺ (NCX) a funcionar em sentido inverso para fazer a extrusão de Na⁺ e dessa forma acontece a sobrecarga de Ca²⁺ intracelular. Ao passo, que também há diminuição da função contrátil decorrentes do mau funcionamento das bombas iônicas ATP dependentes, Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e Na⁺/K⁺ATPase, sendo a ultima a causa da exacerbação da sobrecarga intracelular de Na⁺ durante a isquemia. As condições ácidas durante isquemia impedem a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) e neste momento há uma contratura dos cardiomiócitos. Durante a reperfusão, a cadeia de transporte de elétrons é reativada, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). Outras fontes de produção de EROs incluem a xantina oxidase (XO) e a NADPHoxidase. As EROs também medeiam a lesão de reperfusão no miocárdio por indução da abertura da PTPM. Na reperfusão há reativação do trocador Na⁺/H⁺ o que resulta na remoção de ácido láctico, restaurando rapidamente o pH fisiológico, reestabelecendo a abertura do PTPM e o estado de contratura dos cardiomiócitos. A associação destas alterações que ocorrem durante a I/R são as responsáveis pelos danos causados e podem levar a morte celular decorrentes da reperfusão e, possivelmente, todos estes eventos regulam o PTPM (SEIDLMAYER et al., 2015).

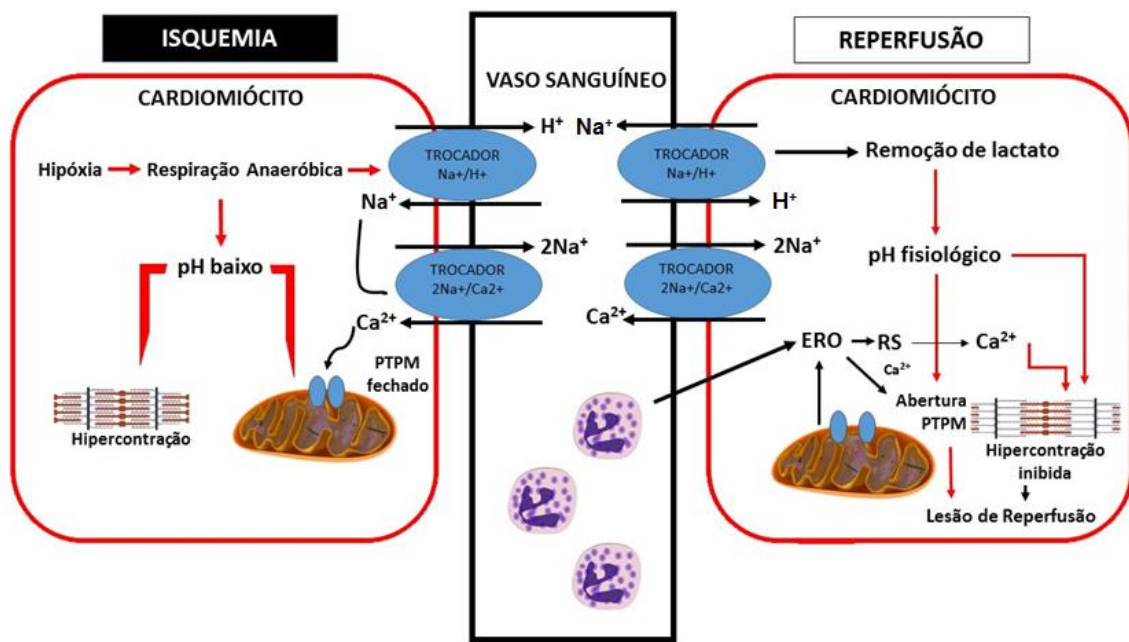


Figura 1. Mudanças metabólicas e bioquímicas em resposta a isquemia e reperfusão. Adaptado de Hausenloy, et. al. 2013. EROs (Espécies Reativas de Oxigênio); RS (Retículo Sarcoplasmático); PTPM (Poros de transição de permeabilidade mitocondrial).

Ao longo dos anos se descobriu o envolvimento da ativação ou bloqueio de vários canais e receptores na limitação da lesão de I/R. Os peptídeos natriurético tipo B (BNP) e tipo-C (CNP), e o fator natriurético atrial tipo C (C-ANF) são citoprotetores, limitando o tamanho do infarto. A ativação dos canais para K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}) também é cardioprotetora. Peptídeos natriuréticos modulam canais K_{ATP} em cardiomiócitos ventriculares normóxicos. Isso pode estar associado com a sua capacidade de aumentar as concentrações intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (BURLEY et al., 2014).

Foi demonstrado que os canais K_{ATP} , mais especificamente, as subunidades Kir6.1 possuem interação com a proteína da junção-gap, a conexina 43 (Cx-43). Essa interação está envolvida na sobrevivência celular durante a hipóxia e é regulada pela proteína quinase C (PKC) (WAZA; ANDRABI; HUSSAIN, 2014).

A entrada de Ca^{2+} na célula durante a I/R através do NCX regula canais para K^+ ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}) na vasculatura coronária. Estes canais desempenham um papel chave na regulação do tônus vascular, modulam a vasoconstrição e o potencial de membrana, atenuando as lesões de reperfusão. Bloqueando esses canais na membrana, descobriu-se que os canais mitocondriais (mito K_{Ca}) apesar de apresentarem características biofísicas similares

aos da membrana plasmática, apresentam papéis fisiológicos bastante distintos. De fato, os principais papéis hipotéticos para estes canais incluem o ajuste do volume da matriz mitocondrial, a regulação da produção de EROs, a regulação da sobrevivência celular e/ou mitocondrial e a proteção contra morte celular por isquemia (TANO E GOLLASCH, 2014).

2.2.1. POSSÍVEIS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA AS LESÕES DE REPERFUSÃO

Intervenções terapêuticas nos estágios iniciais da lesão de reperfusão são essenciais para a reparação cardíaca. Vários estudos experimentais têm demonstrado a eficácia de drogas no sentido de prevenir ou atenuar os danos causados pelas lesões de reperfusão pós-isquemia. Alguns dos efeitos cardioprotetores têm sido associados à superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), manitol, alopurinol, vitamina E, N-acetilcisteína, compostos quelantes de ferro, inibidores da enzima conversora da angiotensina e antagonistas dos canais para Ca^{2+} (BOLCAL et al., 2007; HEINEN et al., 2014; KLISHADI et al., 2015; WANG et al., 2015).

Recentemente foram realizados estudos em animais investigando possível tratamento para reduzir a lesão de reperfusão pós-isquemia. A este respeito tem sido demonstrado várias estratégias, entre elas, o uso de agonistas e antagonistas de receptor canabinóide tipo 2. O tratamento com o agonista JWH-133 mostrou efeitos benéficos nos modelos experimentais de ligadura da artéria coronária (LAC) e isquemia global *ex vivo*. Esse agonista reduziu o tamanho do infarto, o estresse oxidativo e a infiltração de neutrófilos, bem como inibiu citocinas como o $\text{TNF-}\alpha$. Além disso, inibiu a morte celular, recuperou a função ventricular esquerda e impediu a abertura do PTPM (DEFER et al., 2009; LI et al., 2014; MONTECUCCO et al., 2009). Os agonistas HU308 e AM630 também demonstraram efeitos benéficos diminuindo o tamanho do infarto e reduzindo a produção de EROs e $\text{TNF-}\alpha$ em corações de camundongos submetidos a LAC (WANG et al., 2012). O agonista AM1241 aumentou o número de células progenitoras hematopoiéticas e a proliferação de cardiomiócitos, por outro lado, reduziu a concentração sérica de malondialdeído (MDA), $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 (WANG et al., 2014). O tratamento com canabidiol em coelhos submetidos a LAC reduziu a concentração de troponina cardíaca I (cTnI), o infiltrado de leucócitos e inibiu apoptose. Além disso, diminuiu a obstrução microvascular e reduziu a área do infarto (FENG et al., 2015).

Investigações também têm sido relacionadas à inibição de dipeptidil peptidase-4 (DPP4), também conhecida como CD26. Os inibidores de DPP4, vildagliptina e sitagliptina,

foram eficazes na redução do tamanho do infarto e prevenção da disfunção cardíaca, melhorando a função mitocondrial e reduzindo a geração de EROs, tanto em modelo de isquemia global *ex vivo* como também em LAC (CHINDA et al., 2014; HAUSENLOY et al., 2013; INTACHAI et al., 2015). Porém, os inibidores BI 14361 e linagliptina reduziram o tamanho do infarto sem melhorar a função cardíaca, mas aumentaram o recrutamento de células progenitoras hematopoiéticas em modelo de LAC (HOCHER et al., 2013).

Também foram observados benefícios com relação ao uso das adipocitocinas, estas são proteínas e peptídeos bioativos produzidos e secretados pelo tecido adiposo, o qual no organismo humano possui papel de órgão multifuncional. O inibidor do receptor de visfatina, o FK866, mostrou ser benéfico tanto em modelo *in vivo* como também *in vitro* realizado com ratos. No primeiro, reduziu a área do infarto e a concentração sérica de quimiocina ligante 2 (CXCL2), e inibiu o recrutamento de neutrófilos. Experimentos *in vitro* demonstraram que FK866 suprime a liberação da citocina CXCL2 por monócitos periféricos e células Jurkat. (MONTECUCCO et al., 2013). Da mesma forma, o tratamento com omentina ou chemerina-15, adipocitocina, reduziu a área do infarto, diminuiu a infiltração de neutrófilos bem como a de macrófagos e a apoptose em modelo de LAC (CHANG et al., 2015; KATAOKA et al., 2014).

Drogas pertencentes a outras classes farmacológicas, dentre elas, antagonistas do receptor da angiotensina II, o eprosartan, também demonstraram bom resultado em coração isolado suíno, já que o pré-tratamento com o mesmo foi associado a uma significativa melhora da função cardíaca regional, sob condições isquêmicas (DOHMEN, 2014). Um outro composto, o ácido vanílico (10 e 20 mg/kg) melhorou significativamente a recuperação da função cardíaca e diminuiu a região do infarto na isquemia-reperfusão do coração isolado de ratos (DIANAT et al., 2015). A ranolazina, uma droga clinicamente aprovada para o tratamento de arritmias ventriculares cardíacas e angina instável, também demonstra bons efeitos, entretanto seu mecanismo de ação não está totalmente esclarecido. Estudos sugerem que esta droga atua bloqueando a corrente de Na^+ bem como a atividade do complexo I mitocondrial, ou ainda, que modula o metabolismo mitocondrial. Em experimentos de I/R global *ex vivo* utilizando coração de cobaia, a perfusão de ranolazina diminuiu a concentração de Ca^{2+} , a área de infarto e a apoptose (ALDAKKAK et al., 2011).

A utilização de antioxidantes também tem demonstrado diversos benefícios. O Ebselen, organoselênio sintético, em isquemia global *ex vivo*, reduziu a área do infarto, a concentração de glutatona foi preservada e a expressão de HSP72 aumentada (BALJINNYAM et al., 2006). O Fasudil, inibidor da Rho-quinase, em modelo de LAC

reduziu a expressão de Bax e caspase-3, aumentou a expressão de Bcl-2 e AKT e diminuiu a área do infarto e a apoptose (JIANG; ZHANG; ZHANG, 2013). A Edaravona, sequestrador de radicais livres, reduziu a área do infarto e melhorou significativamente a concentração sérica de marcadores de lesão miocárdica, estresse oxidativo, e taxa de apoptose em modelo de LAC (ZHANG et al., 2013).

A literatura tem demonstrado a importância da utilização dos produtos naturais como proposta terapêutica. Flavonoides extraídos das folhas do espinheiro branco, *Hawthorn crataegus*, foram eficazes na redução da atividade da MPO, IL-1 e TNF- α e aumentou a expressão de GRK2 em modelo de LAC (FU et al., 2013). O efeito cardioprotetor do extrato de *Ganoderma lucidum* foi avaliado em experimentos de isquemia global em corações de ratos. A administração deste extrato na dose de 400 mg/kg diminuiu a morte de cardiomiócitos e reduziu a contratatura cardíaca na reperfusão, essa substância ainda apresentou propriedade antioxidante (LASUKOVA et al., 2015). O pré-tratamento de ratos com diosgenina, um fitoestrógeno, demonstrou ter efeitos antiarrítmicos na isquemia global *ex vivo*, com ativação de canais mitocondriais de K⁺ sensíveis a ATP (mitoK_{ATP}) (BADALZADEH et al., 2014).

2.3. ESTRESSE OXIDATIVO

Em 1954 Commoner et. al. demonstraram pela primeira vez a presença de radicais livres em sistemas biológicos. Posteriormente vieram outros estudos que associaram os radicais livres a vários mecanismos patogênicos como mutagenicidade, morte celular e câncer (FLOYD, 1981). Com esses estudos descobriu-se SOD, responsável pela formação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a partir do ânion superóxido (O₂⁻) em amostras de tecidos saudáveis, levando a acreditar que radicais livres estariam participando do controle fisiológico celular (MCCORD E FRIDOVICH, 1969). Os estudos subsequentes vieram a demonstrar que os radicais livres participam ativamente do controle fisiológico celular, não atuando somente como agentes deletérios a biomoléculas, mas que também podem regular estruturas importantes da funcionalidade celular (SANTOS et al., 2011a).

O O₂ surgiu na atmosfera terrestre há cerca de 3,5 bilhões de anos e é um dos elementos da atmosfera mais abundantes, constituindo aproximadamente 21% do ar inspirado (CANTIN E WOODS, 1999). Além de ser constituinte da atmosfera o O₂ também é constituinte da água e de inúmeros óxidos, fazendo essa molécula ser tão importante para a vida. É essencial aos processos oxidativos de biomoléculas para a síntese energética celular.

Na produção aeróbia de energia a célula produz água (H_2O) e dióxido de carbono (CO_2) a partir da glicose através da oxidação pelo O_2 . A utilização do O_2 neste sistema eficaz de produção de energia leva a formação de substâncias tóxicas que causam lesão direta a vários órgãos, dentre eles, o coração (WINSLOW, 2013).

O O_2 possui a propriedade de ser um elemento altamente oxidante e eletronegativo tendo um bom desempenho na fosforilação oxidativa. Esse processo acontece dentro de uma organela especializada, a mitocôndria. Sob condições fisiológicas, metabólitos potencialmente tóxicos derivados do O_2 são produzidos em pequenas quantidades através das reações de transferência de elétrons no metabolismo aeróbico, mas são rapidamente removidos por mecanismos próprios de proteção. A mitocôndria utiliza O_2 para gerar ATP como energia e isso são feito através da cadeia respiratória usando o transporte de elétrons. Os derivados da maioria dos processos catabólicos são a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH_2), que são as formas reduzidas. Processos metabólicos usam NAD^+ e FAD^{+2} (forma reduzida) para o transporte de elétrons adicionando íons hidreto (H^-), sendo assim, transformam-se em sua forma oxidada (NADH e FADH_2). Estes elétrons são passados de NADH ou FADH_2 para a membrana através de transportadores de elétrons até que, finalmente, resulta na produção de O_2 e H_2O . Os H^+ são transportados para o espaço intermembranar em três pontos específicos da cadeia, este transporte cria uma maior concentração dos mesmos no espaço intermembranar do que na matriz, assim é ativada a produção de ATP pela ATP sintase. Entretanto, esse processo gera EROs e, na mitocôndria, a principal é o O_2^- . Embora este não seja um oxidante forte, é um precursor da maior parte das outras espécies tornando-se também envolvido na propagação de reações em cadeia de oxidação (figura 2).

Os transportadores de elétrons presentes na mitocôndria são:

I (NADH-ubiquinona oxidoreductase) - Proteína integral que recebe elétrons na forma de íons hidreto do NADH e os repassa para a ubiquinona.

II (Succinato-ubiquinona oxidoreductase) - Proteína periférica que recebe elétrons de succinato (metabólito intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico) formando fumarato e FADH_2 . Do succinato os elétrons são recebidos pelo FAD (grupo prostético da proteína) e formam FADH_2 . Os elétrons são então transferidos para ubiquinona.

Q (Ubiquinona/ubiquinol) - Ubiquinona (forma oxidada da molécula) recebe elétrons de várias fontes diferentes; a partir dos complexos I, II, desidrogenase glicerol-3-fosfato e flavina mononucleotídeo. Após isso, sua forma reduzida (ubiquinol) transfere seu elétron para o complexo III.

III (Ubiquinol-citocromo C oxidoreductase) - Proteína integral que recebe elétrons do ubiquinol e os transfere para o citocromo c.

IV (citocromo c oxidase) - Proteína integral aceita elétrons do citocromo c que transfere os mesmos para o O_2 produzindo H_2O dentro da matriz de mitocôndria.

ATP Sintase - Proteína que contém várias subunidades diferentes e é diretamente responsável pela produção de ATP via fosforilação quimiosmótica.

Acredita-se que aproximadamente 95% do O_2 absorvido é utilizado para a síntese de ATP e os outros 5% são convertidos em radicais livres (MURPHY, 2009; TURRENS, 2003).

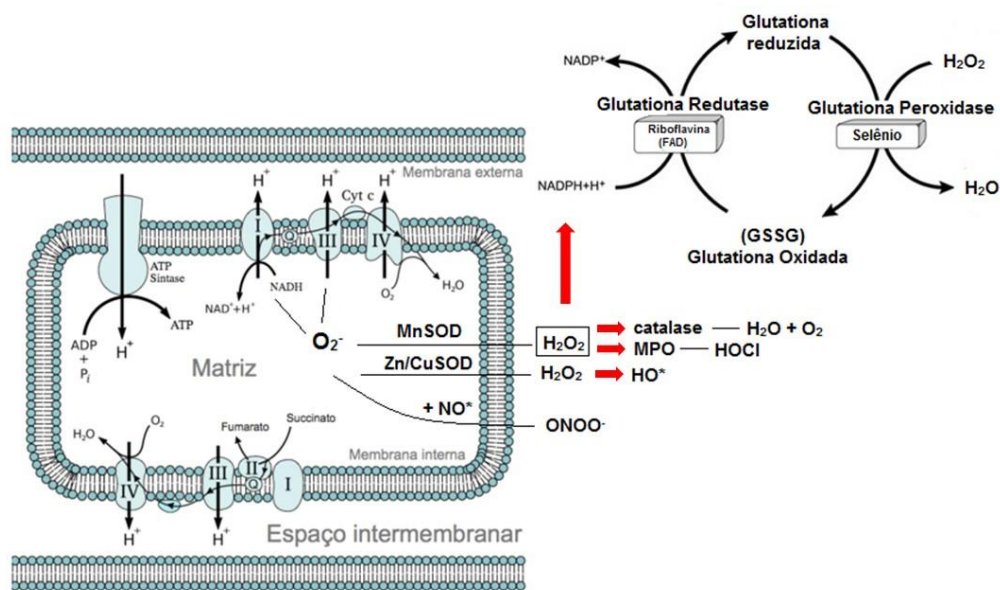


Figura 2. Principais mecanismos da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondrial. Elaborado a partir de informações de Stowe e Camara (2009). Os principais centros produtores de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) são os complexos I e III, embora pequenas quantidades podem ser formadas no complexo II e IV. O transportador de elétrons do complexo III ubiquinol (Q) é reduzido a ubiquinol (QH_2), que transfere um elétron para o citocromo c (Cy C). A resultante semiubiquinol (Q^{\cdot}) é oxidada de volta para a ubiquinol pelo citocromo b (Cy b), e também pode transferir elétrons para o oxigênio formando $O_2^{\cdot-}$. As principais rotas para formação de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) foram apresentadas, assim como enzimas do sistema antioxidante, trazendo como se faz a remoção de EROs e a formação de outras espécies como o $ONOO^{\cdot-}$ (peroxinitrito).

A mieloperoxidase (MPO) é liberada a partir de grânulos citoplasmáticos de neutrófilos e monócitos por um processo de desgranulação, reagem com o H_2O_2 formado pela explosão respiratória para formar um complexo que pode oxidar uma grande variedade de substâncias. Entre eles os ácidos hipohalosos ($HOCl$, $HOBr$, HOI). A MPx é uma heme-enzima, o que confere coloração esverdeada aos exsudatos purulentos. Estes produtos do sistema de MPO- H_2O_2 -cloreto são oxidantes poderosos que podem ter efeitos biológicos importantes (KLEBANOFF, 1999).

A enzima XO atua na cadeia metabólica das purinas e catalisa a oxidação da xantina (ou hipoxantina) pelo O_2 molecular. Dessa forma, contribui significativamente para a lesão de I/R por gerar O_2^- . Normalmente a XO existe na forma desidrogenase, mas é convertida para forma oxidase em tecidos isquêmicos. A xantina desidrogenase, catalisa a conversão da xantina à ácido úrico sem produzir as formas reduzidas do O_2 molecular mas utiliza como cofator a NADH. Entretanto, a xantina desidrogenase é convertida à XO durante curtos períodos de isquemia seguidos de reperfusão. Ambas as formas estão presentes abundantemente em hepatócitos. Baseados nesses dados, alguns autores demonstraram que em episódios de I/R cardíaca há aumento excessivo na formação de XO e O_2^- (SAYED et al., 2013).

Sabe-se que a XO contribui significativamente para a lesão de I/R, gerando EROs. Há uma correlação positiva entre XO e AMI e outros marcadores cardíacos, como creatina quinase (CK-MB). A alteração da albumina sérica humana tem sido recentemente avaliada como marcador de isquemia cardíaca com alta sensibilidade, mas moderada especificidade. Essa proteína de 585 aminoácidos (66,5 kDa), possui na região N-terminal, a sequência de N-Asp-Ala-His-Lis que tem demonstrado ser um sítio de forte ligação aos metais de transição, como o cobalto, cobre e níquel, e caracteriza-se, também, por ser a região mais sensível à degradação, se comparada as outras regiões da albumina (MOTHES E FALLER, 2007). O processo isquêmico causa uma diminuição na capacidade de ligação da albumina aos metais, surgindo a AMI. Foi demonstrado que em pacientes com infarto do miocárdio com segmento ST elevado, as concentrações séricas de XO e AMI foram significativamente maior no grupo I. Estes resultados confirmam o papel da enzima XO na doença cardíaca isquêmica com envolvimento de AMI, a um nível detectável, durante a fase precoce de necrose (SAYED et al., 2013).

Embora várias enzimas produzam EROs, a Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase (NADPH oxidase) é a mais significativa (HANCOCK; DESIKAN; NEILL, 2001). A atividade da NADPH oxidase é controlada por um sistema regulador que envolve o complexo Rac da proteína G (BOKOCH E DIEBOLD, 2002; BOKOCH E KNAUS, 2003) (Figura 3). Nas membranas celulares normalmente há incorporado um heterodímero composto pelos polipeptídeos $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$, que contêm dois grupos heme, bem como um grupo de FAD, permite a transferência de elétrons a partir de NADPH citosólico através da membrana para o O_2 molecular sem atividade de NADPH oxidase (HANCOCK; DESIKAN; NEILL, 2001). Acredita-se que a compensação de carga ocorre quando $gp91^{phox}$ age como um canal de íon H^+ . Após a estimulação, uma série de polipeptídeos ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$) transloca-

se para a face interna da membrana plasmática para formar um complexo enzimático totalmente ativo. Sugere-se que a atividade de algumas das famílias de NADPH oxidases (Nox) é risco para doenças. Porém a Nox4, que é constitutivamente ativa, tem baixa produção de H_2O_2 , e foi relatada sua atividade benéfica atuando como enzima endógena anti-aterosclerótica (SCHÜRMANN et al., 2015).

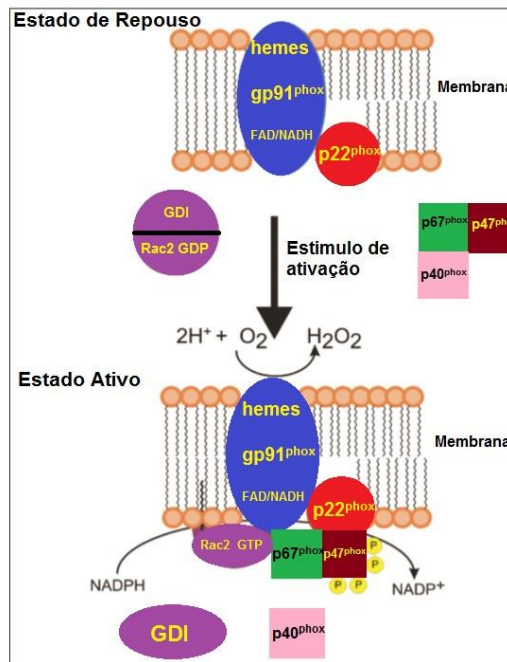


Figura 3. Principais mecanismos da geração de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (ERO). Adaptado de Held e Newick, 2009. Grupos heme (hemes); Polipeptídeos (gp91^{phox} (NOX 2), p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}); Proteínas Rabs da família das GTPases (GDI e GDP), Proteína Rac 2 (Rac 2); Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfatase (NADPH).

Trabalhos demonstraram que as EROs possuem um papel importante na sinalização celular, incluindo apoptose, expressão genética e ativação de cascatas de sinalização celular. A interação de EROs com transportadores de Ca^{2+} está bem elucidada, mostrando que vários destes são modulados por oxidação. A oxidação aumenta a atividade de 1,4,5-trifosfato de inositol e receptores de rianodina (RyR), os principais canais intracelulares de liberação de Ca^{2+} , em resposta à estimulação celular. As mitocôndrias são conhecidas por controlar a concentração de Ca^{2+} através da captação e liberação de Ca^{2+} durante a elevação de sua concentração citosólica. Estudos recentes mostram que antioxidantes também interferem com a sinalização deste íon (CAMELLO-ALMARAZ et al., 2006).

As mais importantes EROs encontradas nos sistemas biológicos são o O_2^- , o H_2O_2 , o radical hidroxila (OH^\cdot), o oxigênio singlet (1O_2) e, tem-se ainda, o ácido hipocloroso (HOCl). Já as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são derivadas diretas do óxido nítrico (NO) e as

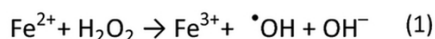
mais significantes em sistemas biológicos são o peroxinitrito (ONOO^-) e o ácido peroxinitroso (ONOOH) (MARTÍNEZ E ANDRIANTSITOHAINA, 2009). É importante ressaltar que radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um elétron desemparelhado na sua órbita externa, o que gera uma molécula instável. Na tentativa de se tornar uma molécula estável o radical livre tenta tirar ou doar elétrons para outro átomo, gerando assim, mais radicais livres. Dessa forma podemos observar que nem toda espécie reativa é um radical livre, mas todo radical livre é uma espécie reativa. Trata-se apenas de uma questão de terminologia, porém a utilização dos termos EROs e ERNs será mais apropriado uma vez que serão abordadas algumas espécies reativas que não são consideradas radicais livres.

O O_2^- é um radical livre muito instável com vida média muito curta, é ainda um oxidante fraco, capaz de oxidar compostos sulfidrilas, catecolaminas, além de outros. A sua maior toxicidade está relacionada ao fato de ser o precursor de outros radicais livres mais citotóxicos e reativos que ele próprio (FRIDOVICH, 1997).

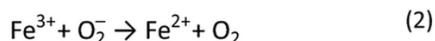
O H_2O_2 é gerado em numerosos processos biológicos, dentre eles, na dismutação do O_2^- , é visto como o principal transmissor de sinais de redox. Não é um radical livre clássico, já que na sua última orbita não possui um elétron desemparelhado. Possui uma grande capacidade de produzir radicais livres, entre eles o OH^\cdot . Embora seja um oxidante forte, barreiras de energia de alta ativação o tornam não reativo com a maioria das moléculas biológicas. Ele reage diretamente com tióis, mas para os tióis de baixo peso molecular e os resíduos de cisteína na maioria das proteínas, a reação é lenta. É substrato das reações com enzimas antioxidantes, tais como a CAT, as peroxidases de glutathione, e peroxirredoxinas (WINTERBOURN, 2013).

O OH^\cdot é o radical mais instável e consequentemente o mais reativo, produzido pela quebra não enzimática do H_2O_2 . Através da reação de Fenton, também pode ser gerado pela reação de Haber-Weiss.

Reação de Fenton:



Redução de Ferro:



Reação de Haber-Weiss:

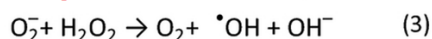


Figura 4. Reação de Fenton e de Haber-Weiss. O ferro ferroso gera o íon e radical hidroxila (OH^\cdot) a partir de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (1). O ânion superóxido (O_2^-) (a ser formado a partir de oxigênio) pode, em seguida, reduzir o ferro férrico de volta para a forma ferrosa (2). A soma de ambas as reações é, por conseguinte, descrito como a formação de O_2 , OH^\cdot e OH^- a partir de O_2^- e de H_2O_2 (3) (CRICHTON, 2009).

O $^1\text{O}_2$ é formado a partir da energização do O_2 , na sua forma estável. Isso altera o sentido do spin de um elétron, gerando uma molécula muito instável.

Além das vias oxidativas clássicas enzimáticas das células, o O_2 molecular também pode ser reduzido por vias não enzimáticas através de reduções sucessivas. Entretanto, durante esse processo, são formados produtos intermediários como o O_2^- , que tende a originar outros produtos como o ONOO^- , o H_2O_2 e o $^1\text{O}_2$. Ainda por via não enzimática (Figura 4), o O_2^- pode ser oxidado por íons Fe^{3+} (reação de Haber-Weiss) e o H_2O_2 pode originar OH^- em presença de Fe^{2+} (reação de Fenton) (KANTI DAS; WATI; FATIMA-SHAD, 2014; LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

O NO e H_2O_2 são sintetizados em miócitos cardíacos e desempenham um papel importante na modulação da sinalização cardiovascular. As três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) catalisam a formação de NO e L-citrulina a partir da L-arginina. As isoformas neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) são constitutivas e suas atividades são reguladas por aumentos nas concentrações intracelulares de cálcio. Diferentemente, a isoforma induzida (iNOS) independe das variações de Ca^{2+} intracelular. Foi descoberto que as concentrações fisiológicas de H_2O_2 ativam eNOS, mas não ativam nNOS. Estimulada pela ativação de H_2O_2 a eNOS depende da fosforilação de AMP e AKT. Além disso, é observado que o aumento da angiotensina II nos miócitos cardíacos é dependente de H_2O_2 . Isso nos mostra que há papéis importantes e diferentes do H_2O_2 no controle da contratilidade cardíaca e dependente da ativação das NOS no coração (SARTORETTO et al., 2011).

Em condições fisiológicas normais, a produção de EROs é normalmente controlada por depuradores de radicais livres endógenos, são as enzimas do sistema antioxidante.

A SOD tem como função proteger o organismo contra a toxicidade do O_2^- . Possui três isoformas básicas: Cobre-zinco SOD (SOD-Cu/Zn), que é enzima de caráter constitutivo presente no citosol celular; manganês SOD (SOD-Mn), enzima expressa em caráter induzido em resposta a situações de estresse celular (estresse oxidativo e citocinas inflamatórias) e encontra-se nas mitocôndrias e SOD extracelular (EC-SOD), enzima constitutiva localizada na matriz extracelular (FRIDOVICH, 1997). A enzima SOD catalisa a conversão (dismutação) de dois mols de O_2^- a um mol de O_2 e um mol de H_2O_2 .

A SOD é ligada covalentemente a 4 moléculas de lecitinas (PC-SOD) e apreciada pelos efeitos benéficos em modelos animais de várias doenças. No entanto, o mecanismo subjacente a estes efeitos ainda não foi elucidado. Foi previamente mostrado que a PC-SOD está localizada na membrana plasmática e nos lisossomos de células. Em comparação com a

SOD, a PC-SOD tem apenas 17% de atividade de remoção de O_2^- . No entanto um estudo com células leucêmicas mostrou que a SOD e a PC-SOD possuem igual atividade de eliminação de O_2^- extracelular com o aumento da quantidade desta na membrana plasmática, neste tipo de células. Além disso, a atividade aumentou quando houve o aumento da quantidade de PC-SOD na membrana plasmática (ISHIHARA et al., 2015).

Se trata de uma enzima citosólica, porém, além de ser encontrada por todo o citosol, pode ser encontrada no núcleo e lisossomas. A Mn-SOD, por sua localização mitocondrial, desempenha papel fundamental na detoxificação do excesso de O_2^- produzido nas reações oxidativas aeróbicas. A EC-SOD é encontrada, principalmente, em áreas de matriz extracelular, ricas em colágeno tipo I. Além disso, a atividade dessas enzimas é regulada por mediadores inflamatórios e fatores irritantes exógenos, como o cigarro e outros poluentes atmosféricos. Alguns estudos demonstram que a atividade da SOD em neonatos ou recém-nascidos após algumas poucas horas de nascimento, já é semelhante à atividade dessa enzima em adultos. Existem dados experimentais que sugerem que a SOD já é expressa entre a 15ª e 17ª semanas de gestação, contudo ocorre ativação enzimática só após o nascimento (KINNULA, 2005).

A CAT é uma enzima comumente encontrada em quase todos os organismos vivos expostos ao O_2 (tais como bactérias, plantas e animais) (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004), sendo responsável pela degradação do H_2O_2 . Cada molécula de CAT pode decompor milhões de moléculas de H_2O_2 a cada segundo. Essa enzima contém a estrutura heme ligada ao ferro. Nos seres humanos a CAT está presente nos perioxissomos e nas mitocôndrias do coração. A CAT é capaz de catalisar uma oxidação divalente (2 elétrons) e possui um sítio ativo redutor. Sua ativação se dá por acúmulo de grandes quantidades de H_2O_2 , mas ela pode atuar na degradação de pequenos hidroperóxidos (metil ou etil hidroperóxidos). Entretanto, não possui a capacidade de degradar grandes moléculas como hidroperóxidos lipídicos (GOODSELL, 2004).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo contendo um aminoácido cisteína (grupo tiol -SH) e está presente no coração, exercendo papel central na proteção contra o excesso de radicais livres. As enzimas relacionadas ao metabolismo da GSH são, junto à CAT, as grandes responsáveis pela detoxificação da maior parte do H_2O_2 produzido pelo organismo. Entretanto, diferentemente da CAT, elas são responsáveis pela degradação de hidroperóxidos, potencialmente nocivos ao organismo. Dentre esses produtos, podem-se destacar os hidroperóxidos lipídicos originados pelo ataque de radicais livres à lípidos poli-insaturados de membranas e alguns produtos das reações catalisadas pelas lipooxigenases. As principais

enzimas relacionadas ao metabolismo da GSH incluem as glutathione peroxidases (GPx), a glutathione redutase (GR), a glutamato cisteína ligase (GCL), a γ -glutamyl cisteína sintase (γ -GCS) e glutathione sintase (GSH sintase).

A enzima chave no ciclo redox, responsável pela degradação do H_2O_2 é a GPx. Essa reação utiliza, especificamente, a glutathione reduzida (GSH) como doadora de elétrons. Nesse processo, há a formação de glutathione dissulfeto (GSSH) que é, conseqüentemente, reduzida à GSH pela GR utilizando o NADPH como doador de elétrons. Oito isoformas da GPx já foram identificadas: GPx1, forma citosólica clássica, encontrada em todas as células; GPx2, isoforma gastrointestinal; GPx3, encontrada no plasma e em secreções do trato respiratório; GPx4, é uma isoforma responsável pela degradação específica de fosfolípidos hidroperóxidos; GPx5, encontrada no epidídimo; GPx6, isoforma olfatória; GPx7 e GPx8, isoformas supostas (CHABORY et al., 2009; FORGIONE, 2002; KRYUKOV et al., 2003; NGUYEN et al., 2011).

O ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E) são linhas de defesa contra a peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados. O ácido ascórbico age no lado extracelular não penetrando as membranas, já α -tocoferol age nas membranas fosfolipídicas celulares e subcelulares. O α -tocoferol é um potente captador de radicais peroxila (LOO^\cdot) que evita a reação de radicais livres com as membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas. Ocorre uma reação subcelular como tocoferol perdendo um hidrogênio transformando-se em tocoferila, que irá para fora da membrana reagir com o ácido ascórbico, sendo transformado novamente em tocoferol (BUETTNER, 1993; TRABER E MANOR, 2012). Estudos recentes têm mostrado que dose elevada de vitamina C pode prevenir ou restaurar comprometimento do fluxo microcirculatório por inibição da ativação de NADPH oxidase e da NOS, aumentando tetrahydrobiopterina, impedindo desacoplamento de fosforilação oxidativa, e diminuindo a formação de O_2^\cdot e $ONOO^\cdot$. Estes efeitos protetores podem promover a recuperação de pacientes que passaram por revascularização de miocárdio em combinação com outros antioxidantes (OUDEMANS-VAN STRAATEN; SPOELSTRA-DE MAN; DE WAARD, 2014). Contudo, mesmo em baixas concentrações, essas vitaminas parecem exercer papel essencial na regulação da biodisponibilidade de GSH.

Fisiologicamente as EROs e ERNs são sintetizadas em pequenas concentrações e seu excesso é removido por mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos, endógenos ou exógenos. Entretanto, em várias condições de estresse ao organismo, há um desequilíbrio entre essas funções pró e antioxidantes. Pode haver um excesso na produção de EROs e

ERNs, e redução das defesas antioxidantes ou associação de ambos em uma condição denominada estresse oxidativo.

2.4. PRODUTOS NATURAIS

A evidência mais antiga do uso das plantas medicinais para a preparação de drogas foi encontrado em uma laje de argila suméria de Nagpur, cerca de 5000 anos de idade. É composta por 12 receitas para a preparação de drogas referindo-se a mais de 250 plantas, algumas delas alcalóides tais como *papoula*, *henbane* e *mandrake* (KELLY, 2009).

Estima-se que existam cerca de 350 mil espécies de plantas. A medicina herbal, também chamada de medicina botânica, fitoterápica ou fitoterapia refere-se a ervas, materiais, preparações e produtos à base de plantas que contêm partes de vegetais ou outros materiais como ingredientes ativos (PAN et al., 2014). Aproximadamente 60% da população mundial ainda depende de plantas medicinais para a sua saúde primária. De acordo com uma pesquisa realizada pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI) nos Estados Unidos da América, 61% das 877 novas moléculas químicas que foram introduzidas como drogas em todo o mundo entre 1981-2002 foram inspiradas por pesquisas utilizando produtos naturais (GAUTAM; SAKLANI; JACHAK, 2007).

Estudos já demonstraram várias ações farmacológicas importantes de plantas medicinais, dentre elas, o efeito protetor da isquemia do miocárdio. Os extratos purificados de *Carthamus tinctorius L.* reduziram o estresse oxidativo e o dano causado pela apoptose através da remoção de EROs e da mediação do sinal PI3K (HAN et al., 2009). A injeção de extrato de *Carthamus tinctorius L.* também reduziu IL-6, TNF- α , proteína Bax e a expressão de Bcl-2 conduzindo, assim, à diminuição da inflamação e da apoptose celular (WAN et al., 2011).

Espécies de plantas ainda servem como uma fonte rica de compostos biologicamente ativos, mas poucas espécies de plantas foram exaustivamente investigadas sobre suas propriedades medicinais (AMOAHA et al., 2014) e, portanto, existe um interesse renovado em pesquisa com fitoterápicos.

2.4.1. TERPENOS

Terpenos ou terpenóides são derivados biossinteticamente a partir de unidades de isopreno, que tem a fórmula molecular C_5H_8 . Terpenos são uma classe grande e variada de

hidrocarbonetos, produzidos principalmente pelas plantas. Há mais de 10.000 tipos conhecidos de terpenóides que variam a partir de duas unidades de isopreno chamado de monoterpenos aos com unidades de 8 isoprenos, chamados de carotenóides. Terpenóides também podem ser classificados de acordo com o número de estruturas cíclicas (SAXENA et al., 2013).

Biosinteticamente, a maioria dos terpenos são formados pela via do ácido mevalônico em plantas, mas eles podem ser formados também pela via 2-C-metileritritol 4-fosfato (ZHANG E CHEN, 2014). As formas ativadas de isopreno, Isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalilpirofosfato (DMAPP) participam na via de biossíntese do colesterol (inibidores de HMG-CoA via redutase). À medida que cadeias de unidades de isopreno são construídas, os terpenos resultantes são classificados sequencialmente por tamanho em hemiterpenos (C_5H_8), monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), diterpenos ($C_{20}H_{32}$), sesquiterpenos ($C_{25}H_{40}$), triterpenos ($C_{30}H_{48}$) e tetraterpenos ($C_{40}H_{56}$) (LANGENHEIM, 1994; YADAV; YADAV; GOYAL, 2014).

Os monoterpenos são encontrados em plantas como *Salvia officinalis* (sábão), *Tanacetum vulgare* (tansy), *Mentha spicata* (hortelã) e *Foeniculum vulgare* (erva-doce). Destas e de outras plantas há a extração de óleos essenciais como, por exemplo, o mentol, hortelã-pimenta, limoneno, geraniol, citronela, citrino, cânfora e terpineol. Por isso, os monoterpenos são também utilizados no controle de odores (como fragrâncias em compostos de limpeza) (SAXENA et al., 2013). Os iridoides são monoterpenos, ou seja, são sintetizados a partir de duas unidades de cinco átomos de carbono cada uma, de isopreno, e são portanto essencialmente moléculas de 10 carbonos, embora muitas sofram alterações, com adição ou perda de carbonos, em etapas posteriores de sua biossíntese (ZHANG E CHEN, 2014).

O mentol é um composto orgânico covalente com fórmula molecular $C_{10}H_{20}O$, é feito sinteticamente ou obtido a partir de hortelã-pimenta ou outros óleos de hortelã. Os compostos relacionados incluem, mentona, timol, cimenol e citronelal (FARCO E GRUNDMANN, 2013).

2.4.2. TIMOL

Os alimentos funcionais fazem parte da dieta humana, e são conhecidos por proporcionar benefícios à saúde. Estudos epidemiológicos e experimentos clínicos randomizados realizados confirmaram ou pelo menos sugeriram muitos benefícios à saúde

relacionados aos alimentos funcionais, incluindo diminuição do risco de câncer, diminuição de risco cardiovascular e aumento do sistema imunológico (AL-SHERAJI et al., 2013; BACCHETTI et al., 2014). O crescente interesse em componentes alimentares naturais chamou a atenção para as plantas utilizadas como alimentos ou especiarias que são uma rica fonte de bionutrientes fitoquímicos ou bio-ativos. Fitoquímicos fenólicos incluem um grande grupo de substâncias e são encontrados em quantidades significativas em vegetais, frutas e especiarias. Eles foram considerados como possíveis antioxidantes. Tomilho e orégano tem sido comumente usado em alimentos para dar sabor, aroma e conservação, bem como na medicina popular que foi iniciado pelos antigos gregos, egípcios e romanos. As folhas de tomilho, pertencente à família Lamiaceae são muitas vezes adicionadas à carne (ÜNDEĞER et al., 2009).

Recentemente, tem-se direcionado as atenções para os efeitos protetores de produtos naturais no IAM. Dentre eles, o timol que é um monoterpeno fenólico dietético, encontrado em óleos de plantas tais como tomilho, *Thymus vulgaris*, *Timbra spicata*, *Thymus ciliados*, e como orégano, *Trachyspermum ammi* vulgarmente conhecido como ajwain no subcontinente indiano, *Monarda fistulosa* e sementes de *Nigella sativa* (BASCH et al., 2004; QUIROGA; ASENSIO; NEPOTE, 2015). O timol é biosintetizado em plantas a partir do γ -terpineno e p-cimeno. Esse é o motivo destes últimos estarem sempre presentes em óleos essenciais que contém o timol. Além disso, intermediários biosintéticos também podem estar presentes, como: terpinen-4-ol, álcool cumino e p-cimen-8-ol (KAVOOSI E PURFARD, 2013).

O timol, possui a nomenclatura química de 5-metil-2- (1-metiletil) fenol e tem um peso molecular de 150,22 g/mol e fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ (Figura 5). Tem a forma de grandes cristais incolores brancos ou translúcidos e possui um odor aromático, semelhante ao tomilho, sabor picante e com um leve efeito corrosivo sobre os lábios. É uma substância fracamente solúvel em água com coeficiente de partição n-octanol/água 3,30. Seu ponto de fusão é 52°C, permanecendo líquido em temperaturas consideravelmente mais baixas, enquanto que seu ponto de ebulição é 233°C (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION).

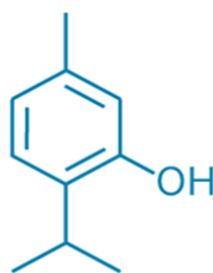


Figura 5. Estrutura molecular do timol.

O timol é prontamente absorvido a partir do trato gastrointestinal após administração oral. É excretado na urina nas primeiras 24 horas após a absorção. Na administração oral aguda, timol pode ser prejudicial, mas praticamente não tóxico. (DL50 Oral em rato 980 mg/kg de peso corporal; DL50 oral em camudongo 640-1800 mg/kg de peso corporal; DL50 dérmica em rato > 2000 mg/kg peso corporal). Ratos sujeitos à administração na ração durante um período de 19 semanas toleraram o timol até 10.000 ppm (equivalente a aproximadamente 667 mg/kg de peso corporal) sem mostrar efeitos nocivos (AUSTGULEN; SOLHEIM; SCHELIN, 1987; BERUFSGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE, 2010).

Há evidências de que o timol possui várias atividades biológicas importantes em vários tipos de tecidos, tais como, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, radioprotetora, vasorrelaxante e antioxidante (MEERAN; SELVARAJ; JAGADEESH, 2014; NAGOOR MEERAN; JAGADEESH; SELVARAJ, 2015b; SANTOS et al., 2011b; YODIM E DEANS, 1999). Dessa forma, o timol tem sido usado na medicina humana em diversas situações. Uma delas é no tratamento tópico de problemas dermatológicos. Em 1878, foi descrito pela primeira vez a utilização tópica do timol no tratamento de eczema e psoríase e tem-se reconhecido que o timol tem trazido resultados positivos para o tratamento de pele com acne. Os mecanismos pelos quais o timol pode alterar a inflamação da pele está associado com desencadear a morte celular por apoptose induzida por ativação de mastócitos (LOUIS, 2012; WECHSLER; HSU; BRYCE, 2014). Devido a sua atividade antimicrobiana, o mesmo pode ser utilizado no tratamento de infecções do trato respiratório superior (DIDRY; DUBREUIL; PINKAS, 1993). Uma outra utilidade é para o cuidado dos dentes, sendo um dos constituintes em antissépticos bucais como o Listerine® (VLACHOJANNIS et al., 2015). O timol está ainda presente no produto chamado Apiguard®, que é utilizado nas colméias para combater o ácaro varroa. Esse produto apresenta-se na forma de gel, funciona como uma esponja e o tamanho da sua malha aumenta ou diminui em função da temperatura ambiente.

Quando a temperatura aumenta, a volatilidade do timol também aumenta e a malha do gel diminui, controlando assim a liberação desta substância (COLOMBO et al., 2006).

O timol também está presente na formulação das pastilhas Angino-Rub®, do laboratório Eurofarma, indicada para processos inflamatórios e dolorosos da boca e garganta. Além de ser um dos constituintes do anestésico Halotano na concentração de 0,01% com a função de estabilizador (THOMPSON E CARLSON, 1989).

Um estudo realizado com ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica demonstrou que o tratamento com timol diminuiu o ganho de peso corporal, gordura visceral, ALT, AST, LDH, uréia, glicose, insulina e concentração de leptina. Além disso, diminuiu a peroxidação lipídica (HAQUE et al., 2014).

O timol interage especificamente com funções neuronais sinápticas com canais neuronais GABA operado por Cl^- (GARCÍA et al., 2008). Demonstrou-se que os canais para Na^+ neuronal e em músculo esquelético foram bloqueados por timol (104-149 $\mu\text{mol/L}$) explicando o efeito antinociceptivo e anestésico local, sendo tão potente quanto a lidocaína (HAESELER et al., 2002).

Foi demonstrado que em tecido cardíaco de ratos infartados com isoproterenol e pré-tratados com timol havia uma ação antioxidante explicando a sua cardioproteção (MEERAN; SELVARAJ; JAGADEESH, 2014). Ainda em tecido cardíaco, dessa vez em células isoladas cardíacas de caninos foi observado que esta substância reduz as correntes de Ca^{2+} de maneira dependente de concentração (MAGYAR et al., 2002, 2004). Szentandrassy et al. (2004) demonstraram, em corações de cobaias e cães perfundidos em sistema Langendorff, que o timol possui ação inotrópica negativa dependente da concentração. No entanto, foi observado que em baixas concentrações o timol reduz o transiente de Ca^{2+} intracelular, sem diminuir a contratilidade. Em concentrações mais elevadas reduz tanto transiente de Ca^{2+} quanto a contratilidade. O mesmo estudo sugere que a ação inotrópica negativa de timol pode ser explicada pela redução de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (RS) devido à combinação da liberação deste íon induzida por timol e inibição da Ca^{2+} ATPase do RS (SERCA).

O timol também promove vasorelaxamento independente do endotélio em aorta isolada de rato, este efeito parece ser mediado através de vários mecanismos que envolvem o bloqueio do influxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática celular (PEIXOTO-NEVES et al., 2010). E já foi demonstrado que esse mecanismo é característico de monoterpenos (SANTOS et al., 2011b).

Diante do exposto acima, a respeito das propriedades biológicas do timol, destacamos a ação antioxidante e cardioprotetora. Hipotetizamos que esta substância poderia ser promissora

para limitar os danos causados pela isquemia e reperfusão cardíaca, e se tornou o foco do presente trabalho.

Ao longo da última década, grandes avanços na detecção precoce de ocorrência isquêmica e do uso de estratégias de reperfusão têm levado a uma redução substancial de morbidade e mortalidade. Para otimizar o resultado clínico nesses pacientes, muitos esforços têm sido direcionados para cardioproteção contra a lesão de reperfusão do miocárdio. A cardioproteção farmacológica demonstrada nos modelos animais ainda estão distantes da utilização na clínica. Mais estudos precisam ser realizados para confirmar o que já se sabe e também para a descoberta de novas alternativas mais eficazes e que tenham menores efeitos colaterais.

Nos dias atuais a medicina molecular está em evidência e o esclarecimento dos seus mecanismos tem sido valorizado na prática clínica. Assim, investigações na área de fisiologia cardiovascular deve incluir (1) a avaliação do papel e o envolvimento de vias moleculares já descritas; (2) a distinção entre efeitos agudos, crônicos e pleiotrópicos das diferentes drogas *in vitro* e *in vivo*, com relação ao possível uso clínico; (3) a utilização de modelos genéticos clinicamente relevantes; (4) o estudo de possíveis alterações na sinalização intracelular; (5) estudar os mecanismos moleculares de doenças cardiovasculares em diferentes condições patológicas. Tal abordagem deve incluir diferenças de desenvolvimento e de gênero, que são particularmente importantes para o campo de doença isquêmica do coração. Espera-se que os pacientes em décadas futuras usufruam do progresso advindo da investigação cardiovascular experimental (OSTADAL, 2009).

3. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o efeito do timol em corações de ratos submetidos à isquemia global do coração seguida de reperfusão.

ESPECÍFICOS

Analizar os efeitos promovidos pelo timol na preservação da função contrátil após I/R.

Verificar o efeito do timol no *status* redox celular cardíaco após I/R.

Mensurar o efeito do timol na limitação da área de infarto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA:

Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe - UFS. Protocolo de número #30/2015. A execução deste trabalho foi feita sob a normativa do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2. SEQUESTRO DE RADICAL LIVRE 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)

Para avaliar a capacidade antioxidante do timol foi realizado o ensaio *in vitro* de sequestro de DPPH, de acordo com Abderrahim et al., (2013) com pequenas modificações. O timol (Sigma-Aldrich) foi diluído em metanol e cinco concentrações diferentes (50, 70, 90, 110 e 130 µg/mL) foram pipetadas em triplicata na microplaca e em seguida adicionado DPPH (40µg/mL) também diluído em metanol. O metanol foi usado para o controle. Após 25 minutos do início da reação as leituras de absorbância a 517 nm foram realizadas em espectrofotômetro de microplacas na temperatura de 25°C.

4.3. ANIMAIS, TRATAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados 48 ratos Wistar, saudáveis, pesando entre 250-300 g. Os ratos foram provenientes do Biotério Setorial da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e mantidos no Biotério do Laboratório de Biologia Cardiovascular e Estresse Oxidativo da UFS. Os animais estiveram sujeitos a um ciclo claro/escuro de 12/12 horas e foram mantidos em gaiolas coletivas, em número de 5 por gaiola em sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) com livre acesso à ração e água.

A administração oral do timol (7,5 mg/Kg/dia dissolvido em 0,5% de DMSO - Dimetil sulfoxido) foi feita por gavagem durante 7 dias, os animais controles receberam salina 0,9% + 0,5% de DMSO (veículo). O tratamento dos animais foi realizado sempre no mesmo horário.

A concentração de timol utilizada neste trabalho foi baseada na literatura, onde constatamos que o pré e co-tratamento com timol nesta concentração, em animais infartados com isoproterenol, exerceu efeito cardioprotetor e apresentou atividade antioxidante (MEERAN; SELVARAJ; JAGADEESH, 2014; NAGOOR MEERAN; JAGADEESH; SELVARAJ, 2015a, 2015b, 2015c; NAGOOR MEERAN; STANELY MAINZEN PRINCE, 2012).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

Grupo 1: Veículo - Animais pré-tratados com veículo (n = 12).

Grupo 2: Timol - Animais pré-tratados com timol (n = 12).

Grupo 3: Veículo + I/R - Animais pré-tratados com veículo e o coração isolado submetido a isquemia e reperfusão (n = 12).

Grupo 4: Timol + I/R - Animais pré-tratados com timol e o coração isolado submetido a isquemia e reperfusão (n = 12).

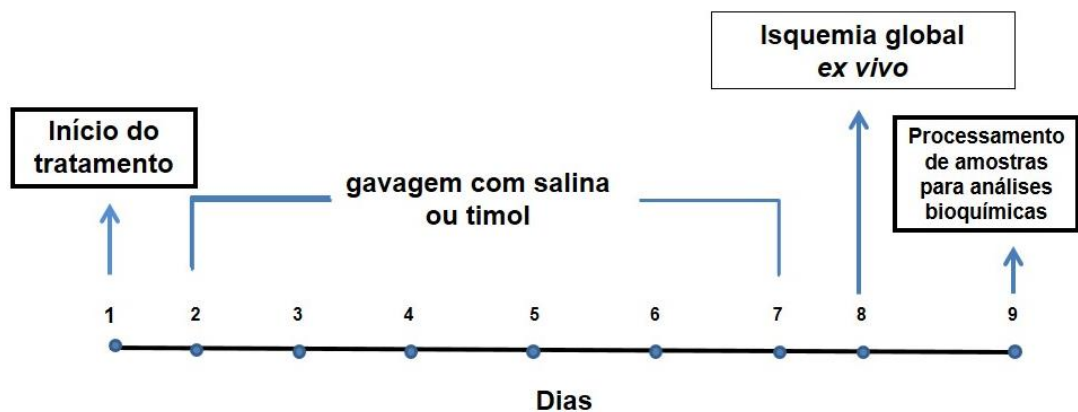


Figura 6. Delineamento experimental. A administração de timol ou salina foi feita por gavagem durante 7 dias. No oitavo dia após o tratamento, foi realizado o protocolo de isquemia global *ex vivo*. As amostras foram processadas e armazenadas para posteriores análises.

4.4. MODELO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO E DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDÍACOS

Após o pré-tratamento dos animais foi administrado 400 UI de heparina e após 15 minutos os mesmos foram mortos por decapitação, em seguida, o tórax foi aberto e o coração retirado. O órgão foi então canulado no sistema de perfusão de órgão isolado do tipo Langendorff de pressão constante (BELL; MOCANU; YELLON, 2011) onde foi feita a isquemia global do coração seguida de reperfusão.

Ainda nessa montagem experimental, o átrio esquerdo foi removido para a colocação de um balonete (Figura 7), conectado a um transdutor pressórico. Após a montagem do sistema, foi aguardado um período de 20 minutos para estabilização, sob a perfusão de tampão de Krebs (tabela 1), oxigenado (95% de O₂ e 5% de CO₂, a 37°C) a uma pressão de 80 cmH₂O e depois disso, o fluxo foi ocluído de forma global durante 30 minutos (Figura 8). Após esse tempo, o fluxo foi reestabelecido e o tampão foi perfundido por 60 minutos sob o monitoramento da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) e foram obtidos a FC e as derivadas

temporais de pressão ventricular máxima (+dP/dt) e mínima (-dp/dt) nas condições basais do coração e durante o período de reperfusão. Os dados foram captados pelo software WindaqEX® e analisados em LabChart7® (ADInstruments).

Tabela 1. Solução de Krebs

Substâncias	Concentrações (mmol/L)
NaCl	118,4
KCl	4,7
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,2
CaCl ₂ . 2H ₂ O	2,5
Glicose	11,7
NaHCO ₃	26,5

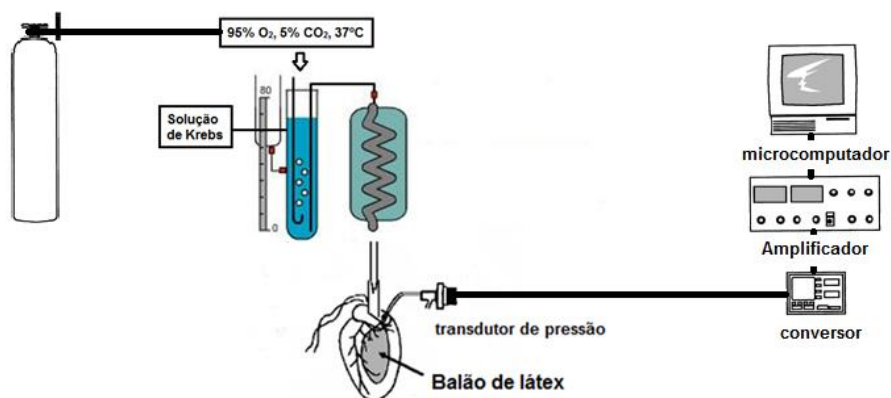


Figura 7. Representação esquemática do sistema de perfusão de coração isolado Langendorff.

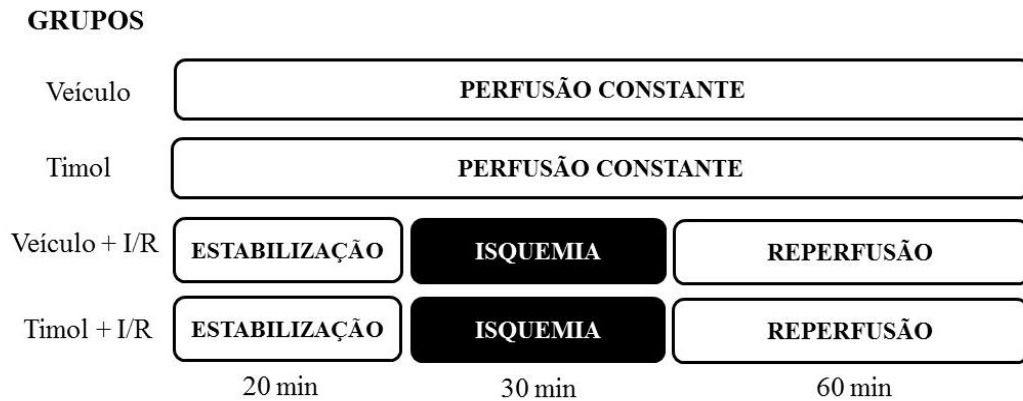


Figura 8. Representação esquemática do protocolo experimental. Os animais de todos os grupos experimentais foram pré-tratados durante 7 dias por gavagem com timol ou veículo. Após o tratamento, foram mortos e os corações montados em sistema de perfusão do tipo Langendorff para o modelo de isquemia global *ex vivo*. Nos corações dos animais dos grupos Veículo e Timol não houve interrupção do fluxo, ou seja, os corações não foram submetidos à isquemia e reperfusão *ex vivo*. Já os grupos Veículo +I/R e Timol + I/R foram submetidos à isquemia e reperfusão *ex vivo*.

4.5. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SEVERIDADE DE ARRITMIAS (ISA)

Conforme Ferreira et al (2001), a severidade das arritmias cardíacas foi avaliada quanto a sua duração nos primeiros 30 minutos do período de reperfusão. Na tabela podemos observar que o surgimento de arritmias com duração menor que 03 minutos foram classificadas como fator 02 e que é considerado irreversível as arritmias com duração igual ou superior a 30 minutos (Tabela 2).

Tabela 2. Determinação do Índice de Severidade de Arritmia (ISA)

Duração (minutos)	Fator
<3	2
3-6	4
7-10	6
11-15	8
16-20	10
21-25	11
26-30	12
>30	Irreversível

4.6. DETERMINAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO

A área de infarto foi detectada e mensurada pela coloração de fatias do coração com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) como descrito por Fishbein et al. (1981). Foram realizadas secções transversais do terço médio do coração com aproximadamente 0,5 cm de espessura. Posteriormente fixadas em formalina tamponada. A coloração com TTC é um método bem aceito para determinar a área do infarto do miocárdio, que proporciona um índice de confiança de morte celular (KUMARAN E PRINCE, 2010). O TTC atravessa as membranas celulares e é metabolizado pelas desidrogenases intracelulares. As células viáveis, com quantidades de NADPH preservados, são coloridas em vermelho tijolo. Entretanto, as células não viáveis, com ruptura de membrana e enzimas, aparecem pálidas após a lavagem e determinam a extensão da lesão do miocárdio. As análises das áreas foram realizadas com o software ImageJ 1.38x.

4.7. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OS ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Após a isquemia global seguida de reperfusão *ex vivo* os corações foram pesados e homogeneizados, em uma proporção de 100 mg/mL de tampão. O tampão utilizado para preparação do tecido para os ensaios bioquímicos foi substituído a depender do protocolo experimental a ser realizado (tabela 3). As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm (Neofuge 15R, HEAL FORCE®) por 30 minutos à 4°C e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios bioquímicos.

Tabela 3. Constituintes dos Tampões Utilizados na Preparação dos Tecidos Cardíacos para os Ensaios Bioquímicos

Tampão	Ensaio	Substância
Tampão Fosfato (10x)	SOD, CAT, Hidroperóxidos e Grupamento sulfidrila	NaCl NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄
Tampão Fosfato (50 mmol/L) Acrescido de KCl (140 mmol/L)	GPx	NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ KCl

Tampão Fosfato (0,2 mol/L, pH 7,5) Acrescido e EDTA	GR	NaH₂PO₄ Na₂HPO₄ EDTA
Tampão Fosfato (0,1 mol/L, pH 7,4) Acrescido e BHT	TBARS	Na₂HPO₄ BHT

4.8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). Resumidamente, as amostras foram diluídas 10x e adicionado NaOH 0,5 M. Após 15 min de incubação, foi adicionada em cada amostra uma solução composta por: 2% Na₂CO₃, 1% CuSO₄ e 2% KNaC₄H₄O₆•4H₂O, na proporção de 100:1:1. Ao final foi adicionado o reagente de folin diluído 2x. Após incubação por 30 min, foi realizada a leitura no comprimento de onda de 630 nm em espectrofotômetro de placa (ELx800, BIOTEK Instruments®, USA). Para confecção da curva de proteína padrão, foi utilizado albumina bovina (Sigma-Aldrich®) em várias concentrações.

4.9. ENSAIOS ENZIMÁTICOS

4.9.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE

A atividade da CAT foi mensurada conforme o método descrito por Nelson e Kiesow (1972) e adaptado por Gioda et. al. (2010). Foi utilizado tampão fosfato (50 mM, pH 7,0). Alíquotas do homogeneizado foram adicionadas ao tampão fosfato e a reação iniciada com a adição de 0,3 mol/L H₂O₂. As medidas foram realizadas em intervalos de 20 segundos (0, 20, 40 e 60 segundos), em cubeta de quartzo, imediatamente após o início da reação, a 25°C, em espectrofotômetro (Hitachi, Japão), em comprimento de onda de 240 nm. A atividade da CAT foi calculada utilizando a fórmula $\Delta E/\text{min}/\mu\text{g}$ proteína. Onde, ΔE é o valor da variação da absorbância entre a primeira e a quarta leitura.

4.9.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

A atividade da SOD foi mensurada através da formação de O₂⁻ pela auto-oxidação do pirogalol e a inibição da redução do sal de tetrazolium (MTT) segundo Madesh e Balasubramanian (1998). Para a avaliação da atividade enzimática o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato (PBS 50 mmol/L, pH 7,4). A reação foi realizada pipetando em microplaca: o

sobrenadante obtido, PBS, MTT (1,25 mmol/L) e pirogallol (100 μ M). A microplaca foi agitada por 5 minutos e logo após este período acrescentou-se DMSO. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (Biotek, ELx800 Absorbance Microplate Reader) a 570 nm. A atividade da SOD foi expressa em unidade de SOD por micrograma de proteína.

4.9.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE

A atividade da enzima GPx foi determinada de acordo com o método descrito por Paglia e Valentine (1967). Para a avaliação da atividade enzimática o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio (50mmol/L), acrescido de KCl (140 mmol/L) e ajustado para pH 7,4. Na microplaca foi colocado tampão fosfato (100 mmol/L, pH 7,0), NADPH (8,4 μ mol/L), GR (10 U/mg de proteína/mL), azida sódica (NaN_3 , 1,125 mol/L), GSH (0,15 mmol/L), H_2O_2 (2,2 mmol/L) e a amostra. A leitura foi feita a 340 nm, 25°C, por 8 minutos. A atividade da Gpx foi avaliada pela oxidação do NADPH. Os resultados foram expressos em $\eta\text{mol/NADPH/min}/\mu\text{g}$ de proteínas.

4.9.4. GLUTATIONA REDUTASE

A atividade da enzima GR foi determinada de acordo com o método de Carlberg e Mannervik (1985), no qual a atividade da redutase é proporcional ao consumo de NADPH monitorado a 340 nm. Para a avaliação da atividade enzimática o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato (0,2 M, pH 7,5) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 6,3 mmol/L), acrescido de Leupeptina (5 mmol/L) e fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 100 mmol/L). Para o ensaio, ao homogenato foram adicionados solução de albumina (0,5 mg/mL de tampão) e GSSH (10 mmol/L). A reação foi iniciada com a adição de NADPH (1,2 mg/mL). A leitura foi feita a 340 nm, 37°C, por 8 minutos. O resultado foi expresso em miliunidade de GR/min/ μg de proteínas.

4.10. TBARS

Para a avaliação da peroxidação lipídica o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,4), contendo butil-hidroxitoluol (BHT; 12,6 mmol/L) na proporção de 1g/5mL. Em seguida, 200 μL do homogenato foi incubado a 90°C por 45 minutos com solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA 0,37%), em meio ácido (15% de ácido tricloroacético - TCA e 0,25 M de ácido clorídrico). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm. Ao sobrenadante, foram acrescentados o n-butanol e a solução saturada de NaCl. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e novamente centrifugada a 14.000 rpm (Heal

Force, Neofuge 15R) por mais 2 minutos. O sobrenadante obtido foi pipetado em microplaca para a leitura a 535 nm, corrigindo pelos valores da absorbância verificada em 572 nm. A quantidade de TBARS produzida foi expressa em $\eta\text{mol/g}$ de tecido e interpretada como marcador de peroxidação lipídica (BOSE et al., 1989).

4.11. MENSURAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS TOTAIS

A quantificação dos hidroperóxidos totais foi realizada de acordo com Jiang et al. (1992). O método se baseia basicamente na oxidação de íons ferroso (Fe^{2+}) a íons férricos (Fe^{3+}) em condições ácidas, pelos hidroperóxidos lipídicos. O indicador utilizado é o xilenol orange que reage com os íons Fe^{3+} produzindo um cromóforo azul-arroxeadado, o qual pode ser medido espectrofotometricamente a 560 nm. O ensaio foi realizado em reagente de FOX, o qual é composto por xilenol orange (0,25 mmol/L), sulfato ferroso amoniacal $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mM), hidroxitolueno butilado (BHT - 4,4 mmol/L), metanol (CH_4O) e ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 97%). Em um microtubo foi adicionado reagente de FOX ao homogenato. Após 30 minutos, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante pipetado em microplaca para a leitura. A quantificação dos hidroperóxidos foi expressa em mol/L e foi utilizado o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.12. MEDIDA DE GRUPAMENTOS SULFIDRILA

Para medida de oxidação de grupamentos tiol de proteínas e peptídeos foi avaliado a concentração de grupamentos sulfidril. As amostras foram incubadas com 3 mmol/L de DTNB por 10 minutos e após 5 minutos de centrifugação a 1000 rpm (Neofuge 15R, HEAL FORCE®) foram lidas em espectrofotômetro de microplacas a 412 nm. Foi construída uma curva padrão de cisteínas para comparação.

4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizado o software Prism 5.1 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Para a determinar as diferenças de médias foi empregado o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni para rejeitar a hipótese de nulidade. O teste *T-Student* foi utilizado quando necessário. Foram considerados valores de $p < 0,05$ como significativos. Neste trabalho os dados quantitativos foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

5. RESULTADOS

5.1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO TIMOL

A remoção de Radicais DPPH pelo timol foi utilizado para avaliação de seu caráter antioxidante. Quando o DPPH aceita um elétron doado por um composto antioxidante, há uma descoloração de DPPH e isso pode ser medido quantitativamente a partir de mudanças na absorbância. A atividade antioxidante do timol é confirmada através da figura 9. Os dados experimentais revelam que o timol tem atividade de eliminação dos radicais DPPH e que essa atividade é dependente de concentração, com uma CE_{50} de $87,04 \pm 2,352 \mu\text{g/ml}$.

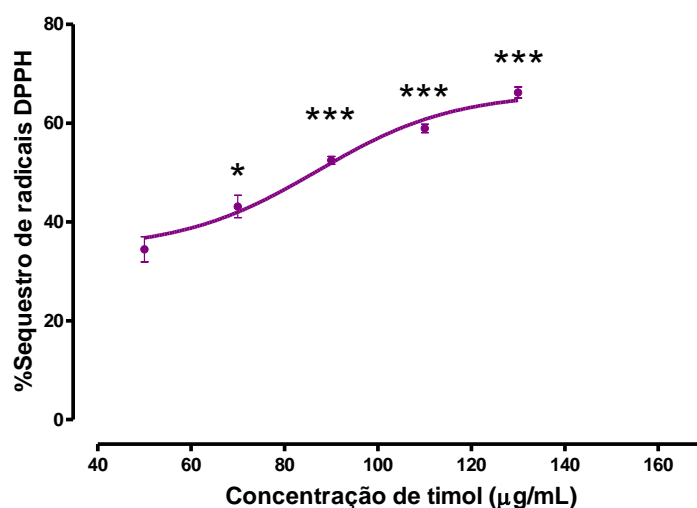


Figura 9. Sequestro de radicais DPPH pelo timol em diferentes concentrações (50, 70, 90, 110 e 130 µg/mL). * $p < 0,05$ 50 µg/mL vs 70 µg/mL; *** $p < 0,001$ 50 µg/mL vs 90, 110 e 130 µg/mL. Valores expressam a média \pm erro padrão da média das medidas obtidas nas triplicatas. ANOVA one way, pós-teste Bonferroni.

5.2. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDÍACOS

Inicialmente foram avaliados os efeitos do pré-tratamento com timol (durante 7 dias) na PDVE, FC, $+dp/dt$ e $-dp/dt$ do coração isolado dos animais. Observou-se que não houve alteração destes parâmetros pelo pré-tratamento com a substância estudada ($7,14 \pm 1,44$ vs $9,49 \pm 0,85$ cmHg; $202,5 \pm 4,22$ vs $226,4 \pm 32,11$ BPM; $173,8 \pm 9,23$ vs $133,0 \pm 19,36$ cmHg/s e $-72,90 \pm 15,10$ vs $-71,42 \pm 21,21$ cmHg/s) (figuras 10A, 10B, 10C e 10D).

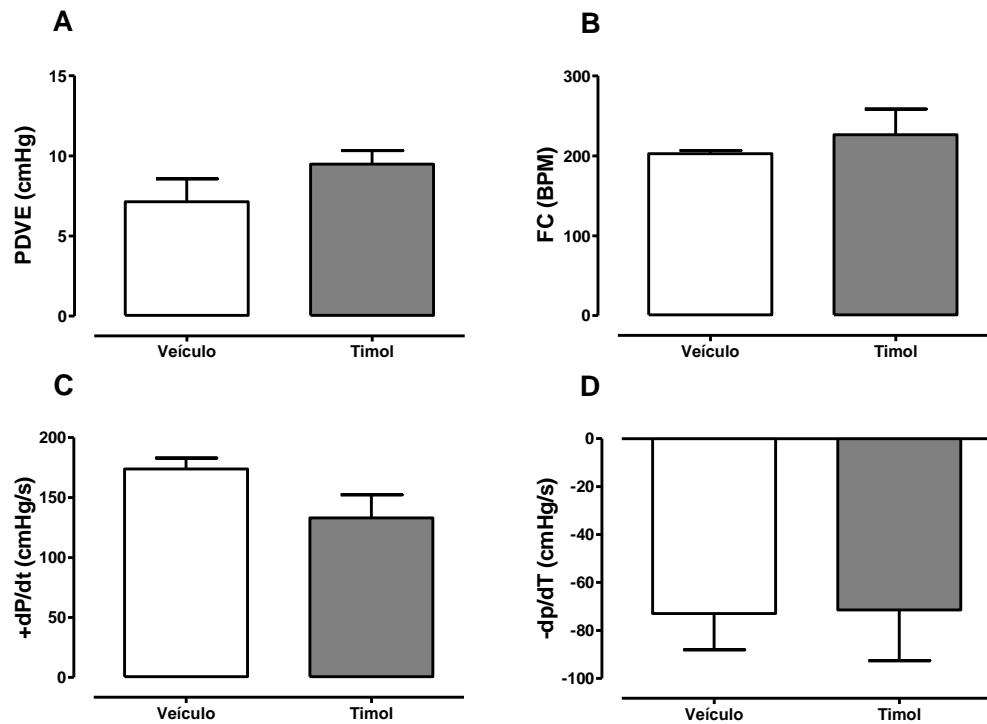


Figura 10. Parâmetros da função contrátil cardíaca avaliados em coração isolado de animais pré-tratados durante 7 dias com timol (7,5 mg/Kg/dia - v.o.). Pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) (A); Frequência espontânea cardíaca pré-isquêmica (B); Derivada temporal de pressão ventricular máxima (+dP/dt) (C) e mínima (-dp/dt) (D) avaliadas na condição pré-isquêmica. Teste *T-student* (n=6 por grupo).

Durante os 30 min de isquemia global a PDVE foi reduzida a zero nos grupos que tiveram o fluxo interrompido, indicando parada momentânea do coração. O pré-tratamento com timol recuperou a PDVE perdida pela interrupção do fluxo de forma significativa quando comparado com os corações dos animais pré-tratados com veículo ($31,48 \pm 2,881$ vs $54,51 \pm 7,078\%$) (figura 11A). A FC espontânea não foi alterada pelo pré-tratamento com o timol em nenhum dos momentos avaliados ($73,46 \pm 4,467$ vs $86,57 \pm 10,81$ vs $74,57 \pm 7,778$ vs $93,57 \pm 1,068\%$) (figura 11B). Também não houve diferença estatística com relação a +dP/dt ($73,46 \pm 7,685$ vs $61,01 \pm 6,137$ vs $73,45 \pm 7,184$ vs $89,90 \pm 8,172$ cmHg/s) (figura 11C) e -dp/dt ($74,44 \pm 10,60$ vs $70,41 \pm 2,131$ vs $91,63 \pm 5,571$ vs $85,43 \pm 4,487$ cmHg/s) (figura 11D).

Para evitar o viés do tempo de duração do protocolo experimental, foram inseridos dois grupos experimentais, os quais não passaram pela I/R. Os parâmetros cardíacos foram analisados nos mesmos intervalos de tempo dos grupos que tiveram o fluxo interrompido.

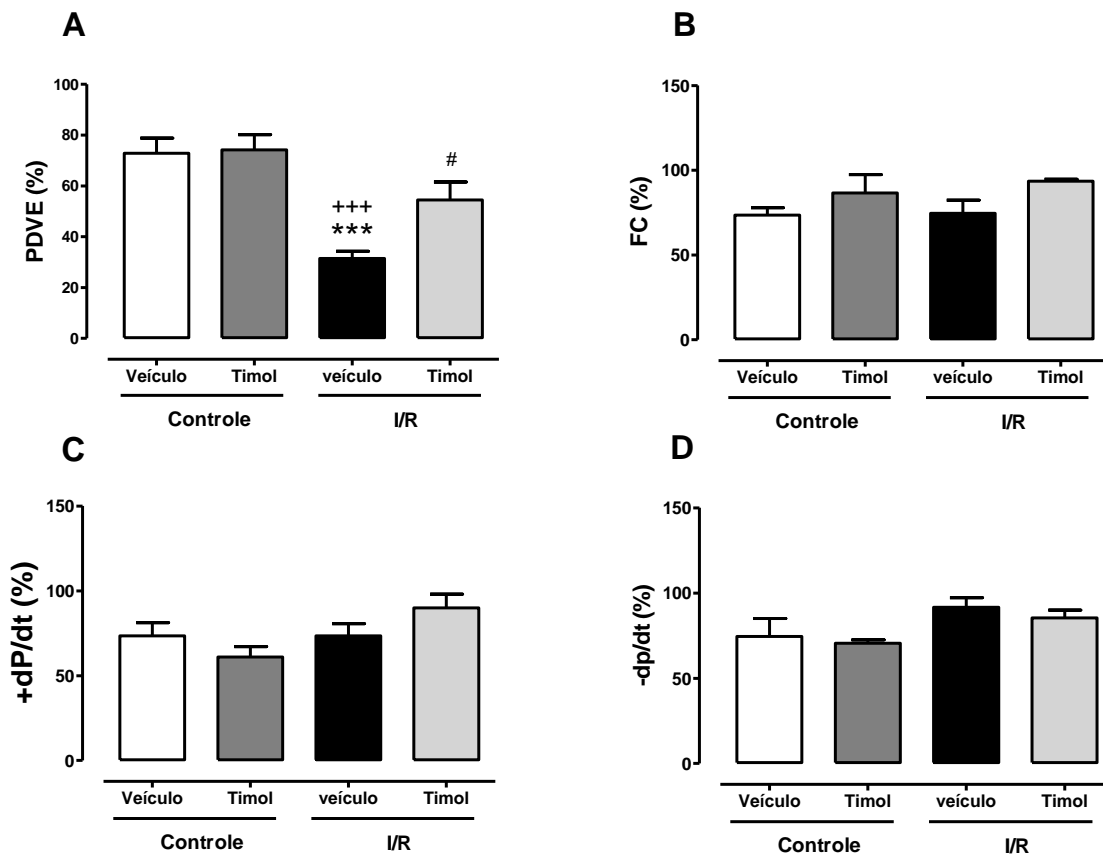


Figura 11. Parâmetros da função contrátil cardíaca avaliados em coração isolado de animais pré-tratados durante 7 dias com timol (7,5 mg/Kg/dia - v.o.) e submetidos ou não à lesão de reperfusão pós-isquemia. Pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) (A), Frequência cardíaca espontânea (B), derivada temporal de pressão ventricular máxima (+dP/dt) (C) e mínima (-dP/dt) (D) no período de reperfusão. *** $p < 0,001$ Veículo vs veículo + IR; +++ $p < 0,001$ timol vs veículo + IR, # $p < 0,05$ veículo + IR vs timol + IR. ANOVA one way, pós-teste Bonferroni (n=6 por grupo).

5.3. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SEVERIDADE DE ARRITMIA (ISA)

Nos 30 primeiros minutos do período de reperfusão foram identificadas as alterações no ritmo cardíaco. A duração dos eventos arritmicos foi pontuada para o cálculo do ISA. Foi observado que o pré-tratamento com timol promoveu menores pontuações no ISA quando comparado ao pré-tratamento com veículo de forma significativa ($5,50 \pm 0,96$ vs $2,67 \pm 0,42$ u.a.) (Figura 12). Observamos que o pré-tratamento com timol promoveu cardioproteção diminuindo alterações de ritmo cardíaco decorrentes da reperfusão.

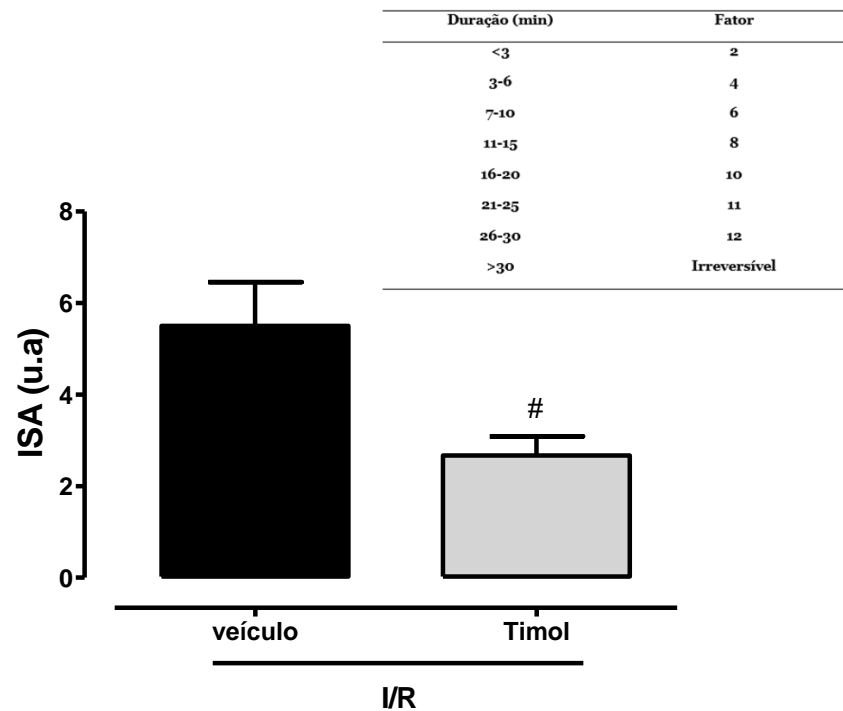


Figura 12. Índice de Severidade de Arritmias (ISA) medido em coração isolado de animais pré-tratados durante 7 dias com timol (7,5 mg/Kg/dia - v.o.) e submetidos à lesão de reperfusão pós-isquemia. [#]p< 0,05 Veículo + I/R vs timol + I/R. Teste *T-Student* (n=6 por grupo).

5.4.DETERMINAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO

A área de infarto foi determinada pela coloração com TTC. A região infartada é visualizada pela coloração diferenciada do tecido em uma região mais clara (figura 13A e 13B). Foi observado maior área de infarto nos corações de animais submetidos à lesão de I/R. O pré-tratamento com timol reduziu significativamente a área do infarto ($39,41 \pm 5,88$ vs $17,59 \pm 4,57\%$) (Figura 14). Verificamos que o pré-tratamento com timol promoveu cardioproteção diminuindo a área da lesão.

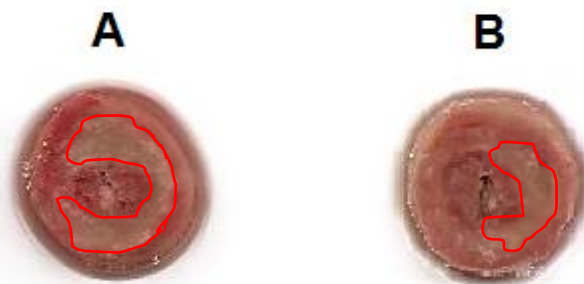


Figura 13. Imagens representativas de secções transversais do coração de ratos pré-tratados durante 7 dias e submetidos à lesão de isquemia e reperfusão. Coloração dos cortes com trifêniltetrazólio (TTC). Corte de coração de animal pré-tratado com veículo e submetido a I/R (A) e Corte de coração de animal pré-tratado com timol (7,5 mg/Kg/dia – v.o.) e submetido a I/R (B). As regiões infartadas.

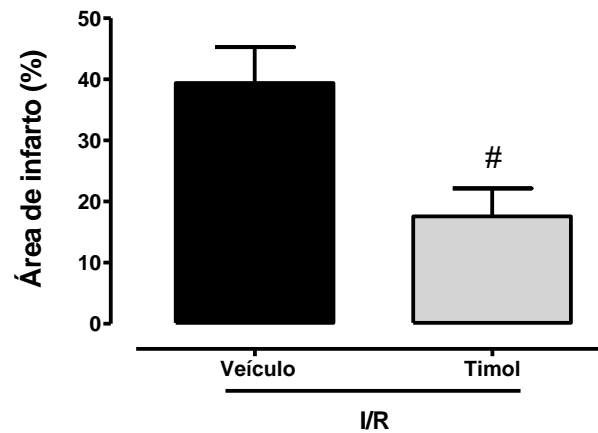


Figura 14. Área de infarto em corações de ratos pré-tratados com timol (7,5 mg/Kg/dia - v.o.) ou veículo e submetidos à lesão de isquemia e reperfusão. Coloração dos cortes com trifêniltetrazólio (TTC). [#]p < 0,05. Test *T-Student* não pareado (n = 6 por grupo).

5.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Os corações dos animais que foram submetidos a lesão de reperfusão pós-isquemia tiveram um significativo aumento nas atividades de todas as enzimas antioxidantes avaliadas (SOD, CAT, GPx e GR) quando comparados aos dos animais pré-tratados com veículo sem isquemia. Já o pré-tratamento com timol reduziu de forma significativa as atividades destas enzimas nos corações submetidos a lesão quando comparados ao veículo (SOD ($0,04723 \pm 0,002950$ vs $0,03202 \pm 0,004039$ U SOD/ μ g de proteína); CAT ($0,02388 \pm 0,002232$ vs $0,004313 \pm 0,001052$ Δ E/min/ μ g de proteína); GPx ($2,236 \pm 0,1849$ vs $1,465 \pm 0,1211$ mU/ μ g de proteína) e GR ($45,12 \pm 4,626$ vs $25,36 \pm 4,635$ mU/ μ g de proteína) (Figura 15A, 15B, 15C e 15D respectivamente).

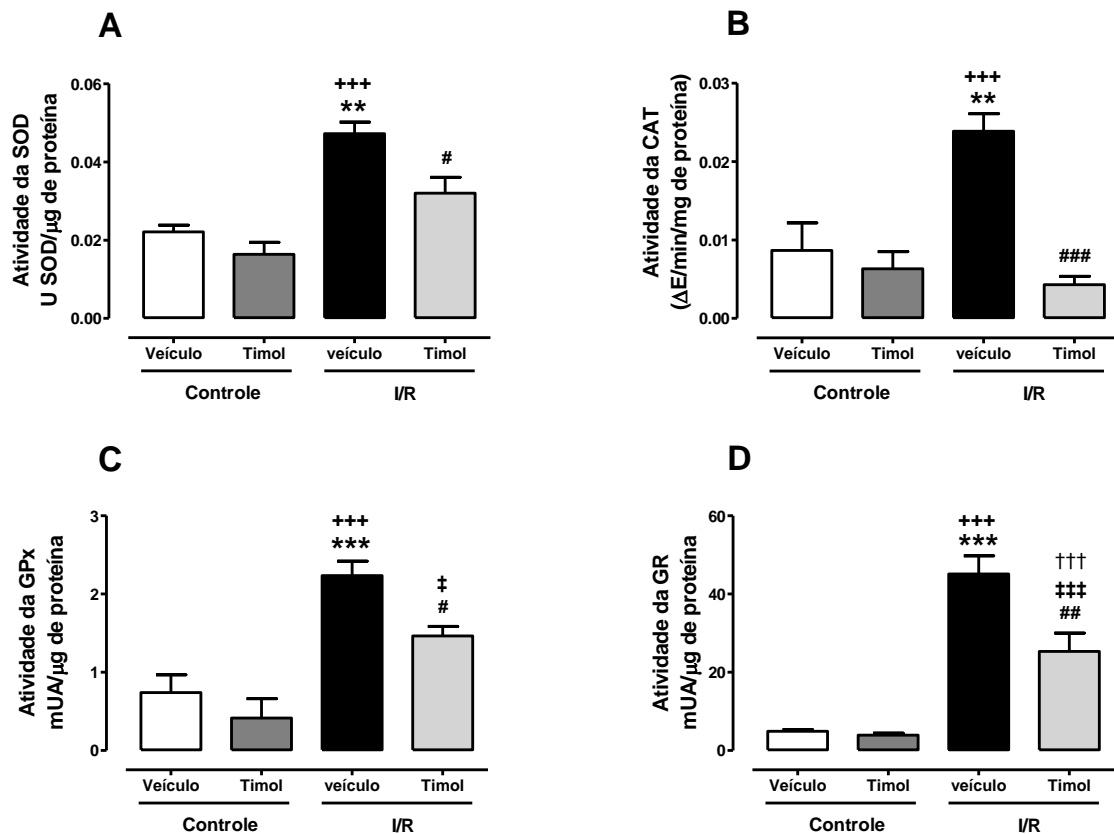


Figura 15. Atividades das enzimas antioxidantes (A) superóxido dismutase (SOD), (B) catalase (CAT), (C) glutathiona peroxidase (GPx) e (D) glutathiona redutase (GR) em corações de ratos pré-tratados com o timol e submetidos ou não a lesão de reperfusão pós-isquemia. ^{*}p<0,01; ^{**}p<0,001 Veículo vs veículo + IR; ⁺⁺⁺p<0,001 timol vs veículo + IR; [#]p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001 veículo + IR vs timol + IR; ^{†††}p<0,001 veículo vs timol + IR; [†]p<0,05; ^{††}p<0,001 timol vs timol + IR. ANOVA one way, pós-teste Bonferroni (n=6 por grupo).

5.6. DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A isquemia induzida nos corações promoveu aumento significativo na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos animais pré-tratados com o veículo ($5,2 \pm 1,1$ vs $13,2 \pm 1,2$ nmol de TBARS/g de coração). O pré-tratamento com timol normalizou esta medida quando os corações foram submetidos a lesão ($13,2 \pm 1,2$ vs $4,3 \pm 0,65$ nmol de TBARS/g de coração) (figura 16A). Ao medirmos hidroperóxido de lipídeos, um produto de lesão oxidativa, observamos o comportamento semelhante ao obtido pelo método de TBARS ($2,448 \pm 0,09686$ vs $0,9953 \pm 0,1251$ μ mol/L) (figura 16B).

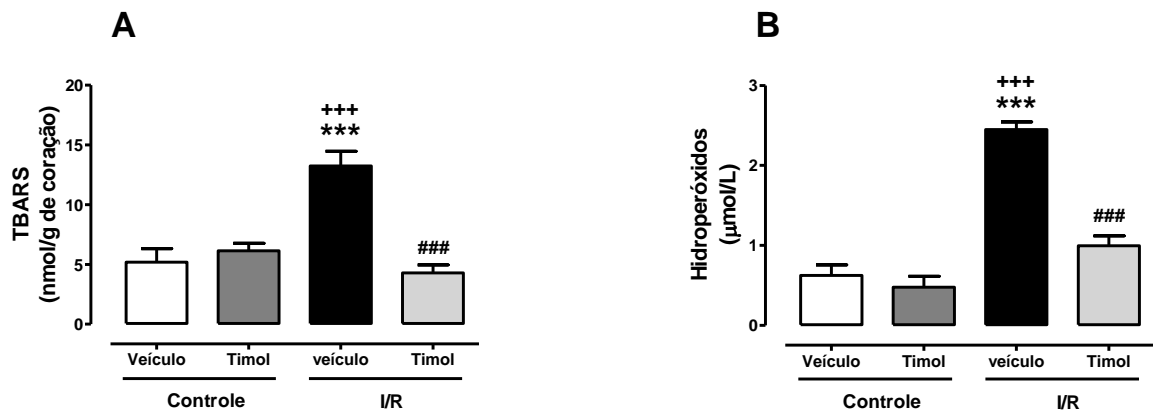


Figura 16. Peroxidação lipídica em corações de animais pré-tratados com timol (7,5 mg/Kg/dia - v.o.) e submetidos a lesão de reperusão pós-isquemia. (A) Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e (B) hidroperóxidos lipídicos. *** $p < 0,001$ Veículo vs veículo + I/R; +++ $p < 0,001$ timol vs veículo + I/R; ### $p < 0,001$ veículo + I/R vs timol + I/R. ANOVA one way, pós-teste Bonferroni (n=6 por grupo).

5.7. MENSURAÇÃO DE GRUPAMENTOS SULFIDRILA NAS PROTEÍNAS

Os corações de animais pré-tratados com timol e submetidos à lesão de I/R apresentaram aumento significativo dos grupamentos sulfidríla quando comparado aos pré tratados com veículo ($83,28 \pm 4,98$ vs $153,4 \pm 15,3$ nmol), sendo este aumento, similar aos valores encontrados nos grupos que não passaram pela isquemia ($126,7 \pm 9,5$ nmol) (figura 17).

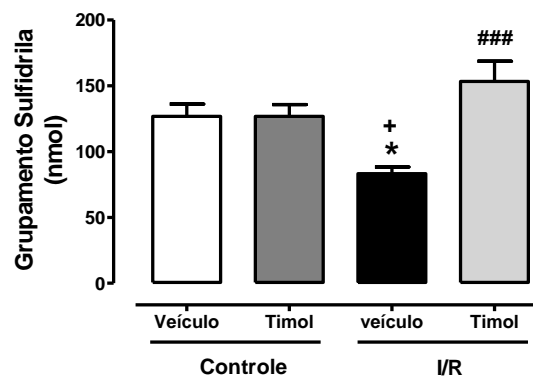


Figura 17. Concentração de grupamentos sulfidríla em corações de animais pré-tratados com timol (7,5 mg/Kg/dia - v.o.) e submetidos a lesão de reperusão pós-isquemia. * $p < 0,05$ Veículo vs veículo + I/R; + $p < 0,05$ timol vs veículo + I/R; ### $p < 0,001$ veículo + I/R vs timol + I/R. ANOVA one way, pós-teste Bonferroni (n=6).

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, utilizamos um modelo de I/R global, no qual foi estudado o efeito do pré-tratamento com timol, monoterpene com característica antioxidante, na limitação das lesões provocadas pela I/R. Entre as alterações subcelulares que acontecem nesse processo, destacamos a sobrecarga intracelular de Ca^{2+} e a excessiva produção de EROs.

Sabe-se que os radicais livres citotóxicos produzidos durante a reperfusão pós-isquemia provocam necrose das células do miocárdio em ratos (SEIDLMAYER et al., 2015). Por isso, torna-se interessante avaliar o efeito do timol *in vitro* na eliminação de radicais livres de DPPH para a avaliação do potencial antioxidante. Em nosso estudo, timol removeu o radical DPPH de forma dependente da concentração, sendo maior na concentração de 130 $\mu\text{g/mL}$ com remoção de 66% deste radical, com uma CE_{50} de $87,04 \pm 2,352 \mu\text{g/mL}$. Nosso estudo revelou que o timol é um potente antioxidante (figura 9).

A propriedade antioxidante encontrada em nosso estudo foi corroborada por Meeran et. al. (2014) e Nagoor Meeran et. al. (2015a) que demonstraram que o timol foi potente tanto na remoção de radicais DPPH, bem como na de H_2O_2 . Esse poder antioxidante também já foi demonstrado através da técnica radiólise de pulso, com a qual foram estudadas as reações de remoção de OH^\cdot e O_2^\cdot . O timol remove eficientemente os radicais OH^\cdot ($k = 8,1 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e O_2^\cdot ($k = 1,1 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), sendo este último em uma taxa mais baixa. Esse estudo revela que o timol é um potente antioxidante com pouco potencial pró-oxidante (VENU et al., 2013). É relatado capacidade antioxidante de outros terpenos, a exemplo do camazuleno, triterpene aromático com a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{16}$, que é mais eficiente que o timol em remover radicais DPPH ($\text{CE}_{50} = 6,4 \mu\text{g/mL}$) (CAPUZZO; OCCHIPINTI; MAFFEI, 2014). Isto pode ocorrer devido a propriedades relacionadas a sua estrutura química.

É observado também que os terpenos tem característica em remover EROs. O tratamento de ratos com carvacrol, isômero de timol, em modelo de I/R de LAC, demonstrou diminuir a intensidade de DCFH, sonda específica para H_2O_2 , inferindo que o mesmo promove a remoção desta ERO (SONG et al., 2013).

Vários óleos essenciais de plantas que contêm o timol, apresentam ação antioxidante e efeitos cardiovasculares benéficos. Dentre eles, o obtido da *Nigella sativa*, cuja planta já foi descrita ter atividade antioxidante, hipotensora, bloqueador de canal para Ca^{2+} e propriedades diuréticas que podem contribuir para reduzir a pressão arterial. Além disso, exerce efeitos

protetores na isquemia via redução da hiperatividade simpática e estresse oxidativo (BADER, 2015). Outras substâncias encontradas na classe dos monoterpenos, também apresentam efeitos cardiovasculares benéficos. Entre essas substâncias, o carvacrol, isômero do timol, em modelo experimental de LAC e com administração intravenosa de 60 mg/kg, demonstrou limitar o tamanho do infarto, diminuir o estresse oxidativo e apoptose (SONG et al., 2013).

A acidose intracelular gerada durante a isquemia do miocárdio leva a um aumento de Na^+ , que altera o funcionamento de bombas e trocadores iônicos, resultando em sobrecarga intracelular de Ca^{2+} (TANI E NEELY, 1989). Esse fato traz prejuízo a função contrátil cardíaca. Estudos experimentais têm demonstrado que antagonistas farmacológicos do canal para Ca^{2+} administrados no início da reperfusão do miocárdio, reduzem o tamanho do infarto em até 50% (SEGAWA et al., 2000). Foi demonstrado por Magyar et al. (2002) que o timol tem capacidade de reduzir correntes de Ca^{2+} de canais tipo L e K^+ em miócitos ventriculares caninos e humanos. O que poderia ser um fator que contribuiu para nossos achados.

Visto que o timol interfere com as correntes iônicas e que as mesmas governam a função contrátil e elétrica das células cardíacas, observamos que o pré-tratamento com esta substância tem ação cardioprotetora uma vez que recupera a PDVE sem alterar a FC (figura 11), também reduz a duração dos eventos arritmicos cardíacos (figura 12), e reduz a área de lesão do infarto (figura 13 e 14). Nossos resultados corroboraram com Nagoor Meeran et al. (2015), que mostraram, em modelo de infarto por isoproterenol que o pré e co-tratamento com timol previne o surgimento das alterações elétricas típicas do coração infartado sugerindo cardioproteção.

Foi mostrado por Szentandrassy et al. (2004) que o timol (100 μM) tem efeito inotrópico negativo. Promove, ainda, abertura prolongada do receptor de rianodina (RyR), sem alterar a condutância deste canal. Este fenômeno não foi dependente de voltagem e não está relacionado ao sítio de ligação da rianodina. Nesse mesmo estudo foi mostrado que timol inibiu a SERCA. Acredita-se que a liberação de Ca^{2+} somado à inibição da SERCA são os responsáveis pela ação inotrópica negativa do timol. No entanto, foi observado que em baixas concentrações (50 - 100 μM) o timol reduz o transiente de Ca^{2+} intracelular sem diminuir a contratilidade, mas em concentrações elevadas (150 - 350 μM), reduz tanto o transiente de Ca^{2+} quanto a contratilidade (SZENTANDRÁSSY et al., 2004).

O canal para Ca^{2+} tipo L e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) também podem estar envolvidos com arritmias dependentes de repolarização pois modulam a entrada de Ca^{2+} e a contratilidade. A inibição da corrente de Ca^{2+} tipo L promove efeito inotrópico negativo, já a inibição do NCX tem o efeito oposto. O bloqueio de ambos pode ser benéfico para controlar

as arritmias e a hemodinâmica cardíaca (BOURGONJE et al., 2013). Esse fato nos sugere que estejam ocorrendo modificações em vários componentes intracelulares, já que no nosso estudo não foi observado alteração na contratilidade, no entanto, o timol demonstrou ter efeitos benéficos na I/R.

Neste mesmo contexto, sabe-se que a ativação de correntes de K^+ apresenta efeito cardioprotetor em vários modelos (WANG et al., 2004; ZHAO et al., 2015). Em músculo esquelético o timol diminuiu as correntes de K^+ (SZENTANDRÁSSY et al., 2003) semelhante ao que acontece em miócitos cardíacos (MAGYAR et al., 2002). Porém, o timol exibiu ações gastroprotetoras em modelos de úlceras agudas e crônicas, através de mecanismos que envolvem ativação dos canais K_{ATP} (RIBEIRO et al., 2015). Uma outra sugestão para atenuar a lesão de I/R é através da ativação de canais mito K_{ATP} e que esses canais podem ser modulados por radicais livres (BADALZADEH et al., 2014). Possivelmente, o timol exerce o efeito cardioprotetor observado neste trabalho por induzir a expressão destes canais para K^+ nas células cardíacas e/ou aumentar a condutância deste íon por meio destes canais.

Observamos que o timol pode apresentar efeitos diferentes dependendo da concentração utilizada e também do tipo de célula ou tecido. Em trabalhos que utilizaram células em cultura também foi evidenciado sua ação nas correntes iônicas e sinalização intracelular.

Em células Madin-Darby de rim canino o timol causou aumento na $[Ca^{2+}]_i$ (200-500 μM) e induziu apoptose (300-500 μM) dependente de concentração (CHANG et al., 2014). O mesmo efeito foi observado em linhagem de osteoblastos numa investigação de osteosarcoma (CHANG et al., 2011) e em um outro estudo com linhagem celulares de glioblastoma, DBTRG (HSU et al., 2011).

Em músculo esquelético o timol (158 μM) induziu liberação de Ca^{2+} , inibiu a SERCA e ativou o RyR (SÁRKÖZI et al., 2007). Esta substância é ainda capaz de ativar o receptor transiente potencial A1 humano (hTRPA1), expresso em células de rim embrionário humano 293 (HEK293), aumentando o Ca^{2+} intracelular (LEE et al., 2008).

Em neutrófilos humanos observou-se que o timol sequestrou O_2^- e inibiu a atividade de canais para Ca^{2+} tipo L, o autor sugere que essa inativação do canal é por sequestro de radicais livres (HUANG et al., 2005).

Os radicais livres podem modular os canais e receptores. O estresse oxidativo é conhecido por ativar canais para Ca^{2+} (MAHMUD et al., 2009). Neste trabalho o pré-tratamento com timol reduziu o tamanho do infarto do miocárdio, indicando que o timol

impede danos na membrana e diminui a morte das células cardíacas, protegendo o coração na lesão de I/R.

Com o exposto acima, podemos sugerir que os efeitos cardioprotetores promovidos pelo timol na função contrátil e na integridade do tecido encontrados em nosso trabalho, possivelmente ocorrem devido ao bloqueio dos canais para Ca^{2+} e ativação dos canais para K^{+} . Porém, algum outro componente da maquinaria contrátil pode também ser modulado, já que não há alteração na contratilidade cardíaca. As alterações na concentração de radicais livres induzidas pela reação com o timol podem também modular esses canais.

Durante a reperfusão pós-isquemia há o aumento na produção de EROs, dentre as quais, o O_2^- é o primeiro radical gerado e leva a lesão e morte celular (SEIDLMAYER et al., 2015). A eliminação do excesso de radicais é muito importante já que estes podem ser prejudiciais em sistemas biológicos. A SOD promove a conversão de O_2^- em H_2O_2 , que, subsequentemente, é metabolizado pela CAT ou GPx em O_2 e H_2O , assim esta enzima protege as células de danos oxidativos (RAJADURAI; STANELY MAINZEN PRINCE, 2006). Em nosso estudo observamos que o pré-tratamento dos animais com timol normalizou a atividade da SOD (figura 15A) e da CAT (figura 15B) nos corações submetidos a I/R. Entretanto, Nagoor Meeran et. al. (2015) demonstraram diminuição da atividade da SOD em corações de animais infartados pela administração de isoproterenol. Os autores sugeriram que a diminuição da atividade desta enzima se deve a célula estar danificada. Dessa forma, o O_2^- gerado no local do dano interagem com a SOD e a CAT, resultando na diminuição da atividade catalítica dessas enzimas e acumulação de O_2^- , que também danifica a célula, este não foi o nosso caso. Song et al. (2013), demonstraram em seu estudo que, o carvacrol, isômero do timol, em modelo experimental de LAC, com 45 min de isquemia e 2 horas de reperfusão, com administração intravenosa de 60 mg/kg, tiveram uma maior ativação de atividade de Mn-SOD e CAT quando comparado aos animais tratados com veículo. É importante ressaltar que apesar de o carvacrol e o timol serem isômeros eles podem ter atividades antagônicas. Wickens (2001) relatou que o O_2^- inicia diretamente a peroxidação lipídica. O aumento da produção de radicais livres é um dos mecanismos bioquímicos que provocam a lesão de reperfusão pós-isquemia. Porém, o timol parece remover o excesso de radicais livres por outro mecanismo que não abrange a ativação enzimática.

Para manter a atividade protetora da glutathiona é necessário a oxidação da glutathiona (GSH) a glutathiona dissulfeto (GSSG), é ainda necessário a regeneração do GSH para o ciclo catalítico desta enzima. Para isso, há o envolvimento da atividade interdependente de três grupos de enzimas: a glutathiona oxidase (GO), GPx e a GR. As duas primeiras enzimas

catalisam a oxidação de GSH à GSSG e a última, é responsável pela regeneração de GSH a partir de GSSG, na presença de NADPH (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008). Dessa forma, é necessário que essas enzimas sejam ativadas conjuntamente. Em nossos experimentos vimos que a I/R aumentou a atividade das enzimas GPx (figura 15C) e GR (figura 15D), o que nos faz inferir que estes processos causam aumento da concentração de radicais livres, provocando a necessidade de uma maior atividade enzimática para remover esses radicais. Já no grupo de animais pré-tratados com timol houve diminuição da atividade dessas enzimas nos corações submetidos a I/R, provavelmente pela redução da concentração de radicais livres gerados durante estes processos. Esta sugestão se deve ao fato do timol apresentar potencial de remover radicais livres *in vitro* (figura 9), o que reflete sua ação antioxidante já relatada nos sistemas biológicos (HASHEMIPOUR et al., 2013; HORVATHOVA et al., 2014).

A peroxidação lipídica, um tipo de dano oxidativo em ácidos poli-insaturados e tem sido associada com alterações na estrutura da membrana e na inativação enzimática. O aumento de produtos da peroxidação lipídica em corações de animais que passaram pela I/R parece ser uma fase inicial de danos para o tecido, tornando-o mais susceptível a lesão oxidativa (STANELY MAINZEN PRINCE; PRISCILLA; DEVIKA, 2009). No presente trabalho foi observado que, nos corações de animais que passaram pela I/R, estavam aumentadas as concentrações de TBARS (figura 16A) e de hidroperóxidos lipídicos (figura 16B), indicando desestabilização de membrana miocárdica por aumento da produção de EROs. O pré-tratamento de ratos com timol preveniu o aumento da concentração de TBARS e de hidroperóxidos lipídicos nos corações submetidos à I/R. Assim, podemos inferir que o timol inibiu a peroxidação lipídica por eliminação do excesso de EROs produzidos durante I/R, mantendo a integridade da membrana miocárdica, uma vez que a atividade das enzimas antioxidantes não foi aumentada pelo pré-tratamento. Esse resultado corrobora com Kim et al. (2014) que mostraram que timol diminuiu a concentração de MDA, uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, em hepatócitos que foram induzidos a lesão oxidativa. YU et al.(2013), demonstraram que o tratamento com carvacrol, isômero do timol, reduziu a concentração de MDA em modelo de LAC.

Meeran et al. (2014) também mostraram efeito antioxidante semelhante em seu estudo com animais infartados. Os pesquisadores observaram maior quantidade de ácido úrico no plasma destes animais, já o pré e co-tratamento com timol normalizou a concentração desta substância no plasma. É interessante destacar que os referidos autores utilizaram a mesma concentração de timol que utilizamos no presente trabalho. Os autores discutem que o ácido

úrico é o antioxidante aquoso mais abundante nos seres humanos e que o mesmo contribui para eliminação de radicais livres do organismo. Relatam ainda que esta substância é particularmente eficaz na remoção dos radicais OH^\cdot , O_2^\cdot e ONOO^\cdot podendo ter um papel fisiológico importante na prevenção da peroxidação lipídica. As concentrações de ácido úrico aumentam durante o estresse oxidativo e isquemia aguda, e estas concentrações aumentadas podem ser um mecanismo compensatório que confere proteção contra o aumento da atividade dos radicais livres.

A grande capacidade redutora da GSH é proporcionada pela quantidade de grupamentos tiol ou sulfidril (SH) presentes em sua estrutura molecular. A combinação da abundância de glutathione nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidril suporta a proposta de que a GSH surgiu, na evolução bioquímica, como uma proteção contra as EROs e compostos eletrofílicos gerados em processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008). Em nosso estudo observamos que os eventos gerados na I/R provocam redução da quantidade de grupamentos SH, e o pré-tratamento dos animais com timol preveniu a redução dos mesmos nas proteínas cardíacas (figura 17). Este resultado, mais uma vez evidencia o efeito cardioprotetor do timol na isquemia global cardíaca e apresenta esta substância como potencial alternativa farmacológica para limitar as lesões de reperfusão pós-isquêmicas.

7. CONCLUSÃO, SUGESTÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostra que o timol apresenta efeitos cardioprotetores contra I/R. O pré-tratamento dos animais com timol (7,5 mg/kg/dia – durante 7 dias) preserva a função contrátil cardíaca após a isquemia global e reperfusão, reduz danos a componentes celulares e limita a área de infarto. Essa ação parece ocorrer por mecanismos independentes da ativação das enzimas antioxidantes SOD e CAT, porém dependentes da ativação parcial da GPX e GR presentes na célula cardíaca. É ainda possível que esta ação ocorra devido a estrutura molecular do timol remover os radicais livres presentes no tecido, e com isso não há a necessidade que estas últimas enzimas funcionem em sua atividade máxima catalítica. Pode ainda ser devido sua interferência com correntes iônicas sarcolemas, além de componentes da maquinaria contrátil cardíaca. Entretanto mais estudos experimentais e clínicos são necessários para comprovação e indicação da utilização do timol em cirurgias cardíacas eletivas para redução das lesões provocadas pela reperfusão do miocárdio.

REFERÊNCIAS

- ABDERRAHIM, F. et al. Rapid high-throughput assay to assess scavenging capacity index using DPPH. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 788–94, 15 nov. 2013.
- ALDAKKAK, M. et al. Ranolazine reduces Ca²⁺ overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 4, p. 381–392, out. 2011.
- ALPERT, J. S. et al. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 36, n. 3, p. 959–69, set. 2000.
- AL-SHERAJI, S. H. et al. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1542–1553, out. 2013.
- AMOA, S. K. S. et al. Herbalists, traditional healers and pharmacists: a view of the tuberculosis in Ghana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 1, p. 89–95, jan. 2014.
- ANDREENKO, G. V; BESSOLITSINA, L. A. [Changes in fibrinolysis system in patients with acute myocardial infarction in intracoronary administration of fibrinolysin with heparin]. **Terapevticheskiĭ arkhiv**, v. 49, n. 4, p. 8–13, 1977.
- AUSTGULEN, L. T.; SOLHEIM, E.; SCHELIN, R. R. Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol. **Pharmacology & toxicology**, v. 61, n. 2, p. 98–102, ago. 1987.
- BACCHETTI, T. et al. Effect of black and red cabbage on plasma carotenoid levels, lipid profile and oxidized low density lipoprotein. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 128–137, maio 2014.
- BADALZADEH, R. et al. Anti-arrhythmic effect of diosgenin in reperfusion-induced myocardial injury in a rat model: activation of nitric oxide system and mitochondrial KATP channel. **The journal of physiological sciences : JPS**, v. 64, n. 6, p. 393–400, 2014.
- BADER, A. A. A. Pharmacology & Toxicology CARDIAC AND NON-CARDIOVASCULAR ISCHEMIA. v. 5, n. 1, p. 53–61, 2015.
- BALJINNYAM, E. et al. Oral pretreatment with ebselen enhances heat shock protein 72 expression and reduces myocardial infarct size. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 29, n. 11, p. 905–13, nov. 2006.
- BASCH, E. et al. Thyme (Thymus vulgaris L.), Thymol. **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v. 4, n. 1, p. 49–67, jan. 2004.
- BELL, R. M.; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M. **Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2011.
- BERUFGGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE. **TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNGEN Nr. 259 thymol CAS-Nr. 89-83-8**. [s.l: s.n.].
- BOKOCH, G. M.; DIEBOLD, B. A. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. **Blood**, v. 100, n. 8, p. 2692–6, 15 out. 2002.

BOKOCH, G. M.; KNAUS, U. G. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! **Trends in biochemical sciences**, v. 28, n. 9, p. 502–8, set. 2003.

BOLCAL, C. et al. Do N-acetylcystein, beta-glucan, and coenzyme Q10 mollify myocardial ischemia-reperfusion injury? **The heart surgery forum**, v. 10, n. 3, 2007.

BOURGONJE, V. J. A. et al. Combined Na(+)/Ca(2+) exchanger and L-type calcium channel block as a potential strategy to suppress arrhythmias and maintain ventricular function. **Circulation. Arrhythmia and electrophysiology**, v. 6, n. 2, p. 371–9, abr. 2013.

BRASILEIRO, A. L. S. a Injuria De Reperfusao Miocardica.Pdf. **Rev SOCERJ**, v. X, n. 2, 1997.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535–43, 1 fev. 1993.

BURLEY, D. S. et al. Natriuretic peptides modulate ATP-sensitive K(+) channels in rat ventricular cardiomyocytes. **Basic Res Cardiol**, v. 109, p. 402, 2014.

CAMELLO-ALMARAZ, C. et al. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. **AJP: Cell Physiology**, v. 291, n. 5, p. C1082–C1088, 1 nov. 2006.

CANTIN, A. M.; WOODS, D. E. Aerosolized prolactin suppresses bacterial proliferation in a model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 160, n. 4, p. 1130–5, out. 1999.

CAPUZZO, A.; OCCHIPINTI, A.; MAFFEI, M. Antioxidant and radical scavenging activities of chamazulene. **natural product research**, v. 28, n. 24, p. 2321–3, 2014.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in enzymology**, v. 113, p. 484–90, 1985.

CHABORY, E. et al. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 7, p. 2074–85, jul. 2009.

CHANG, C. et al. Chemerin15-Ameliorated Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury Is Associated with the Induction of Alternatively Activated Macrophages. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 563951, 2015.

CHANG, H.-T. et al. Effect of thymol on Ca²⁺ homeostasis and viability in MG63 human osteosarcoma cells. **Pharmacology**, v. 88, n. 3-4, p. 201–12, 2011.

CHANG, H.-T. et al. Effects of Thymol on Ca²⁺ Homeostasis and Apoptosis in MDCK Renal Tubular Cells. **The Chinese journal of physiology**, v. 57, n. 2, p. 90–8, 30 abr. 2014.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 61, n. 2, p. 192–208, jan. 2004.

CHINDA, K. et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor reduces infarct size and preserves cardiac function via mitochondrial protection in ischaemia-reperfusion rat heart. **Diabetes & vascular disease research**, v. 11, n. 2, p. 75–83, mar. 2014.

COLOMBO, M. et al. EFFICACY OF THYMOL IN CONTROLLING VARROA DESTRUCTOR ANDERSON AND TRUEMAN USING A RANGE OF COMMERCIAL PRODUCTS WITH DIFFERENT APPLICATION METHODS . n. December 2005, p. 14–16, 2006.

COMMONER, B.; TOWNSEND, J.; PAKE, G. E. Free radicals in biological materials. **Nature**, v. 174, n. 4432, p. 689–91, 9 out. 1954.

CRICHTON, R. **Iron Metabolism**. 3. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009.

DE CASTRO E SILVA JR., O. et al. Basics aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, n. Supplement 3, p. 96–100, 2002.

DEFER, N. et al. The cannabinoid receptor type 2 promotes cardiac myocyte and fibroblast survival and protects against ischemia/reperfusion-induced cardiomyopathy. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 7, p. 2120–30, jul. 2009.

DIANAT, M. et al. Effect of vanillic acid on ischemia-reperfusion of isolated rat heart: Hemodynamic parameters and infarct size assays. **Indian journal of experimental biology**, v. 53, n. 10, p. 641–6, out. 2015.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. [Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination]. **Die Pharmazie**, v. 48, n. 4, p. 301–4, abr. 1993.

DOHMEN, P. M. Eprosartan improves cardiac function in swine working heart model of ischemia-reperfusion injury. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 20, p. 55–62, 2014.

FARCO, J. A.; GRUNDMANN, O. Menthol--pharmacology of an important naturally medicinal "cool". **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 1, p. 124–31, jan. 2013.

FENG, Y. et al. Pharmacologic Effects of Cannabidiol on Acute Reperfused Myocardial Infarction in Rabbits. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 66, n. 4, p. 354–363, out. 2015.

FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. **Hypertension**, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 665–668, 2001.

FISHBEIN, M. C. et al. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. **American heart journal**, v. 101, n. 5, p. 593–600, maio 1981.

FLOYD, R. A. Free radicals in arylamine carcinogenesis. **National Cancer Institute monograph**, n. 58, p. 123–31, dez. 1981.

FORGIONE, M. A. Heterozygous Cellular Glutathione Peroxidase Deficiency in the Mouse: Abnormalities in Vascular and Cardiac Function and Structure. **Circulation**, v. 106, n. 9, p. 1154–1158, 27 ago. 2002.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18515–7, 25 jul. 1997.

FU, J.-H. et al. Hawthorn leaves flavonoids decreases inflammation related to acute myocardial ischemia/reperfusion in anesthetized dogs. **Chinese journal of integrative medicine**, v. 19, n. 8, p. 582–8, ago. 2013.

GARCÍA, D. A. et al. GABA released from cultured cortical neurons influences the modulation of t-[(35)S]butylbicyclophosphorothionate binding at the GABAA receptor Effects of thymol. **European journal of pharmacology**, v. 600, n. 1-3, p. 26–31, 14 dez. 2008.

- GAUTAM, R.; SAKLANI, A.; JACHAK, S. M. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 200–234, mar. 2007.
- GIODA, C. R. et al. Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 298, n. 6, p. H2039–45, jun. 2010.
- GOODSELL, D. S. Catalase. **RCSB Protein Data Bank**, 1 set. 2004.
- HAAF, P. et al. Risk stratification in patients with acute chest pain using three high-sensitivity cardiac troponin assays. **European heart journal**, v. 35, n. 6, p. 365–75, fev. 2014.
- HAESLER, G. et al. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. **European journal of anaesthesiology**, v. 19, n. 8, p. 571–9, ago. 2002.
- HAN, S.-Y. et al. Protective effects of purified safflower extract on myocardial ischemia in vivo and in vitro. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 16, n. 8, p. 694–702, ago. 2009.
- HANCOCK, J. T.; DESIKAN, R.; NEILL, S. J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, n. 2, p. 345–349, 1 maio 2001.
- HAQUE, M. R. et al. Monoterpene phenolic compound thymol prevents high fat diet induced obesity in murine model. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 24, n. 2, p. 116–123, fev. 2014.
- HASHEMIPOUR, H. et al. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance , antioxidant enzyme activities , fatty acid composition , digestive enzyme activities , and immune response in broiler chickens. **Poultry science**, v. 92, p. 2059–2069, 2013.
- HAUSENLOY, D. J. et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and GLP-1 reduce myocardial infarct size in a glucose-dependent manner. **Cardiovascular diabetology**, v. 12, p. 154, 2013.
- HEIJINK, R. et al. A Window on Geographic Variation in Health Care: Insights from EuroHOPE. **Health economics**, v. 24 Suppl 2, p. 164–77, dez. 2015.
- HEINEN, A. et al. Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BKCa signaling pathway. **Experimental Gerontology**, v. 56, p. 99–105, 2014.
- HELD, P.; NEWICK, K. Using BioTek's Synergy™ HT Reader to Measure Reactive Oxygen Species (ROS) Generation in Stimulated Cells. **BioTechniques**, v. 46, n. 1, p. 61–62, 2009.
- HILL, A. J. et al. In vitro studies of human hearts. **The Annals of thoracic surgery**, v. 79, n. 1, p. 168–77, jan. 2005.
- HOCHER, B. et al. The novel DPP-4 inhibitors linagliptin and BI 14361 reduce infarct size after myocardial ischemia/reperfusion in rats. **International journal of cardiology**, v. 167, n. 1, p. 87–93, 15 jul. 2013.
- HORVATHOVA, E. et al. Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-protective effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact Rosmarinus officinalis oil. **Journal of agricultural and food chemistry**,

v. 62, n. 28, p. 6632–9, 2014.

HSU, S.-S. et al. Effect of thymol on Ca^{2+} homeostasis and viability in human glioblastoma cells. **European journal of pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 85–91, 16 nov. 2011.

HUANG, M.-H. et al. Effects of 4-piperidinomethyl-2-isopropyl-5-methylphenol on oxidative stress and calcium current. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 9, p. 1191–7, set. 2005.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, Â. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

INTHACHAI, T. et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improves cardiac function by attenuating adverse cardiac remodelling in rats with chronic myocardial infarction. **Experimental physiology**, v. 100, n. 6, p. 667–79, jun. 2015.

ISHIHARA, T. et al. Scavenging of superoxide anions by lecithinized superoxide dismutase in HL-60 cells. **Molecular bioSystems**, v. 12, n. 1, p. 274–82, 15 dez. 2015.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–9, 1 maio 1992.

JIANG, Z.; ZHANG, T.; ZHANG, J. Protective effects of fasudil hydrochloride post-conditioning on acute myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. **Cardiology journal**, v. 20, n. 2, p. 197–202, 2013.

KANTI DAS, T.; WATI, M. R.; FATIMA-SHAD, K. Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer's Disease. **Archives of Neuroscience**, v. 2, n. 3, 30 ago. 2014.

KATAOKA, Y. et al. Omentin prevents myocardial ischemic injury through AMP-activated protein kinase- and Akt-dependent mechanisms. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 24, p. 2722–33, 24 jun. 2014.

KAVOOSI, G.; PURFARD, A. M. Scolicidal effectiveness of essential oil from *Zataria multiflora* and *Ferula assafoetida*: disparity between phenolic monoterpenes and disulphide compounds. **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, n. 5, p. 999–1005, 26 set. 2013.

KELLY, K. **Early civilizations : prehistoric times to 500 C.E.** New York: Facts On File, 2009.

KIM, Y.-S. et al. Thymol from *Thymus quinquecostatus* Celak. protects against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in Chang cells. **Journal of natural medicines**, v. 68, n. 1, p. 154–62, 2014.

KINNULA, V. L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. **Thorax**, v. 60, n. 8, p. 693–700, ago. 2005.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, n. 5, p. 383–9, 1999.

KLISHADI, M. S. et al. Losartan Protects the Heart Against Ischemia Reperfusion Injury : Sirtuin3 Involvement. v. 18, n. 1, p. 112–123, 2015.

KRYUKOV, G. V et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5624, p. 1439–43, 30 maio 2003.

KUMARAN, K. S.; PRINCE, P. S. M. Caffeic acid protects rat heart mitochondria against isoproterenol-induced oxidative damage. **Cell stress & chaperones**, v. 15, n. 6, p. 791–806, nov. 2010.

KURAPEEV, D. I. et al. New technique of local ischemic preconditioning induction without repetitive aortic cross-clamping in cardiac surgery. **Journal of cardiothoracic surgery**, v. 10, p. 9, 2015.

LANGENDORFF, O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen Pflügers. **European Journal of Physiology**, p. 691–307, 1895.

LANGENHEIM, J. H. Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of chemical ecology**, v. 20, n. 6, p. 1223–80, jun. 1994.

LASUKOVA, T. V et al. Cardioprotective Activity of Ganoderma lucidum Extract during Total Ischemia and Reperfusion of Isolated Heart. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine, GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY**, v. 158, n. 6, p. 739–741, 2015.

LEE, S. P. et al. Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 8, p. 1739–49, abr. 2008.

LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 371–384, 13 maio 2013.

LERCH, R. Oxidative substrate metabolism during postischemic reperfusion. **Basic research in cardiology**, v. 88, n. 6, p. 525–44, 1993.

LI, Q. et al. Mitochondrial permeability transition pore plays a role in the cardioprotection of CB2 receptor against ischemia-reperfusion injury. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 92, n. 3, p. 205–14, mar. 2014.

LOUIS, P. F. **Use thyme as a natural cure for acne**. Disponível em: <http://www.naturalnews.com/035869_acne_natural_cures_thyme.html>. Acesso em: 25 dez. 2015.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 35, n. 3, p. 184–188, 1998.

MAGYAR, J. et al. Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes. **British journal of pharmacology**, v. 136, n. 2, p. 330–338, 2002.

MAGYAR, J. et al. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 487, n. 1-3, p. 29–36, 2004.

MAHMUD, H. et al. Inhibitory effect of thymol on suicidal erythrocyte death. **Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 24, n. 5-6, p. 407–14, 2009.

MARTÍNEZ, M. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. **Antioxidants & redox**

signaling, v. 11, n. 3, p. 669–702, mar. 2009.

MAXWELL, S. R.; LIP, G. Y. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. **International journal of cardiology**, v. 58, n. 2, p. 95–117, 31 jan. 1997.

MAYO CLINIC. **Diseases and Conditions Myocardial ischemia**. Disponível em: <<http://www.mayoclinic.org>>. Acesso em: 5 dez. 2015.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–55, 25 nov. 1969.

MEERAN, M. F. N.; SELVARAJ, P.; JAGADEESH, G. S. Protective efficacy of Thymol on Glycoproteins in Isoproterenol induced myocardial Infarcted rats: An in- vivo and in- vitro study. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 1, n. 2, p. 79–86, 2014.

MINAMINO, T. Cardioprotection From Ischemia/Reperfusion Injury. **Circulation Journal**, v. 76, n. 5, p. 1074–1082, 2012.

MONASSIER, J. P. Reperfusion injury in acute myocardial infarction. From bench to cath lab. Part I: Basic considerations. **Archives of cardiovascular diseases**, v. 101, n. 7-8, p. 491–500, 2008.

MONTECUCCO, F. et al. CB(2) cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 46, n. 5, p. 612–20, maio 2009.

MONTECUCCO, F. et al. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase reduces neutrophil-mediated injury in myocardial infarction. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 6, p. 630–41, 20 fev. 2013.

MOTHES, E.; FALLER, P. Evidence that the principal CoII-binding site in human serum albumin is not at the N-terminus: implication on the albumin cobalt binding test for detecting myocardial ischemia. **Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 2267–74, 27 fev. 2007.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2009.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet (London, England)**, v. 349, n. 9064, p. 1498–504, 24 maio 1997.

NAGOOR MEERAN, F. M.; JAGADEESH, G. S.; SELVARAJ, P. Thymol attenuates altered lipid metabolism in β -adrenergic agonist induced myocardial infarcted rats by inhibiting tachycardia , altered electrocardiogram , apoptosis and cardiac hypertrophy. **Journal of Functional Foods**, v. 14, n. ass, p. 51–62, 2015a.

NAGOOR MEERAN, M. F.; JAGADEESH, G. S.; SELVARAJ, P. Thymol attenuates inflammation in isoproterenol induced myocardial infarcted rats by inhibiting the release of lysosomal enzymes and downregulating the expressions of proinflammatory cytokines. **European Journal of Pharmacology**, v. 754, p. 153–161, 2015b.

NAGOOR MEERAN, M. F.; JAGADEESH, G. S.; SELVARAJ, P. Catecholamine toxicity triggers myocardial membrane destabilization in rats: thymol and its counter action. **RSC Adv.**, v. 5, n. 54, p. 43338–43344, 2015c.

NAGOOR MEERAN, M. F.; STANELY MAINZEN PRINCE, P. Protective effects of thymol on altered plasma lipid peroxidation and nonenzymic antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 26, n. 9, p. 368–373, 2012.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Database; CID=6989**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6989>>. Acesso em: 24 dez. 2015.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 474–478, 1972.

NGUYEN, V. D. et al. Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. **Journal of molecular biology**, v. 406, n. 3, p. 503–15, 25 fev. 2011.

NICOLAU, J. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v. 102, p. 1–61, 2014.

OSTADAL, B. The past, the present and the future of experimental research on myocardial ischemia and protection. **Pharmacological reports : PR**, v. 61, n. 1, p. 3–12, 2009.

OUDEMANS-VAN STRAATEN, H. M.; SPOELSTRA-DE MAN, A. M.; DE WAARD, M. C. Vitamin C revisited. **Critical care (London, England)**, v. 18, n. 4, p. 460, 2014.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 70, n. 1, p. 158–69, jul. 1967.

PAN, S.-Y. et al. Historical Perspective of Traditional Indigenous Medical Practices: The Current Renaissance and Conservation of Herbal Resources. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–20, 2014.

PEIXOTO-NEVES, D. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta: ORIGINAL ARTICLE. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 341–350, 2010.

PINHEIRO, C. P. et al. Prognostic value of stress hyperglycemia for in-hospital outcome in acute coronary artery disease. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 100, n. 2, p. 127–34, fev. 2013.

PIPER, H. M.; GARCÍA-DORADO, D.; OVIZE, M. A fresh look at reperfusion injury. **Cardiovascular research**, v. 38, n. 2, p. 291–300, maio 1998.

QUIROGA, P. R.; ASENSIO, C. M.; NEPOTE, V. Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 95, n. 3, p. 471–9, fev. 2015.

RAJADURAI, M.; STANELY MAINZEN PRINCE, P. Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: biochemical and histopathological evidences. **Toxicology**, v. 228, n. 2-3, p. 259–68, 7 dez. 2006.

REIMER, K. et al. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. **Circulation**, 1977.

RIBEIRO, A. R. S. et al. Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in

rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K(+) channels, and gastric mucus secretion. **Chemico-biological interactions**, 12 dez. 2015.

RUIXING, Y.; WENWU, L.; AL-GHAZALI, R. Trimetazidine inhibits cardiomyocyte apoptosis in a rabbit model of ischemia-reperfusion. **Translational Research**, v. 149, n. 3, p. 152–160, 2007.

SANTOS, C. X. C. et al. Redox signaling in cardiac myocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 7, p. 777–793, 2011a.

SANTOS, M. R. V. et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 764–771, ago. 2011b.

SÁRKÖZI, S. et al. Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 28, n. 2-3, p. 167–74, 2007.

SARTORETTO, J. L. et al. Hydrogen peroxide differentially modulates cardiac myocyte nitric oxide synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 15792–15797, 20 set. 2011.

SAXENA, M. et al. Phytochemistry of Medicinal Plants - ProQuest. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 6, p. 168–182, 2013.

SAYED, O. et al. Ischemic heart diseases in Egypt: role of xanthine oxidase system and ischemia-modified albumin. **Heart and vessels**, v. 29, n. 5, p. 629–637, 2013.

SCHÜRMANN, C. et al. The NADPH oxidase Nox4 has anti-atherosclerotic functions. **European heart journal**, 17 set. 2015.

SEGAWA, D. et al. Calcium antagonist protects the myocardium from reperfusion injury by interfering with mechanisms directly related to reperfusion: an experimental study with the ultrashort-acting calcium antagonist clevipidine. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 338–43, set. 2000.

SEIDLMAYER, L. K. et al. Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: contributions of Ca²⁺, ROS, pH, and inorganic polyphosphate. **Cardiovascular Research**, v. 106, n. 2, p. 237–248, 2015.

SOLER, E. P.; RUIZ, V. C. Epidemiology and risk factors of cerebral ischemia and ischemic heart diseases: similarities and differences. **Current cardiology reviews**, v. 6, n. 3, p. 138–149, 2010.

SONG, X. et al. Carvacrol pretreatment attenuates myocardial oxidative stress and apoptosis following myocardial ischemia-reperfusion in mice. **J South Med Univ**, v. 33, n. 11, p. 1624–1627, 2013.

STANELY MAINZEN PRINCE, P.; PRISCILLA, H.; DEVIKA, P. T. Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats. **European journal of pharmacology**, v. 615, n. 1-3, p. 139–43, 1 ago. 2009.

STOWE, D. F.; CAMARA, A. K. S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 6, p. 1373–1414, jun. 2009.

SZENTANDRÁSSY, N. et al. Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle. **BMC Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 9, 2003.

- SZENTANDRÁSSY, N. et al. Effect of thymol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. **Life Sciences**, v. 74, n. 7, p. 909–921, 2004.
- TALWALKAR, S. S. et al. Ischemia modified albumin, a marker of acute ischemic events: a pilot study. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 38, n. 2, p. 132–7, 2008.
- TANI, M.; NEELY, J. R. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. **Circulation research**, v. 65, n. 4, p. 1045–56, out. 1989.
- TANO, J.-Y.; GOLLASCH, M. Hypoxia and Ischemia-Reperfusion: A BiK Contribution? **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, n. Mdc, p. 811–817, 2014.
- THOMPSON, R. D.; CARLSON, M. Determination of thymol in halothane anaesthetic preparations by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 7, n. 10, p. 1199–1206, jan. 1989.
- TRABER, M. G.; MANOR, D. Vitamin E. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 3, n. 3, p. 330–331, 1 maio 2012.
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of physiology**, v. 552, n. Pt 2, p. 335–44, 15 out. 2003.
- ÜNDEĞER, Ü. et al. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 2037–2043, ago. 2009.
- VENU, S. et al. Oxidation reactions of thymol: A pulse radiolysis and theoretical study. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 117, n. 2, p. 291–299, 2013.
- VLACHOJANNIS, C. et al. A Preliminary Investigation on the Antimicrobial Activity of Listerine®, Its Components, and of Mixtures Thereof. **Phytotherapy research : PTR**, v. 29, n. 10, p. 1590–4, out. 2015.
- WAN, L.-H. et al. Protective effects of Carthamus tinctorius injection on isoprenaline-induced myocardial injury in rats. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 11, p. 1204–9, nov. 2011.
- WANG, N. et al. Linderia strychnifolia is protective against post-ischemic myocardial dysfunction through scavenging hydroxyl radicals and opening the mitochondrial KATP channels in isolated rat hearts. **The American journal of Chinese medicine**, v. 32, n. 4, p. 587–98, 2004.
- WANG, P.-F. et al. Cannabinoid-2 receptor activation protects against infarct and ischemia-reperfusion heart injury. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 301–7, abr. 2012.
- WANG, W. et al. Apocynum venetum Leaf Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Oxidative Stress. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, n. 01, p. 71–85, 2015.
- WANG, Y. et al. Effects of cannabinoid receptor type 2 on endogenous myocardial regeneration by activating cardiac progenitor cells in mouse infarcted heart. **Science China. Life sciences**, v. 57, n. 2, p. 201–8, fev. 2014.
- WAZA, A. A.; ANDRABI, K.; HUSSAIN, M. U. Protein kinase C (PKC) mediated interaction between connexin43 (Cx43) and K⁽⁺⁾(ATP) channel subunit (Kir6.1) in cardiomyocyte mitochondria: Implications in cytoprotection against hypoxia induced cell

apoptosis. **Cellular signalling**, v. 26, n. 9, p. 1909–17, 2014.

WECHSLER, J. B.; HSU, C.-L.; BRYCE, P. J. IgE-mediated mast cell responses are inhibited by thymol-mediated, activation-induced cell death in skin inflammation. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 133, n. 6, p. 1735–43, jun. 2014.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, v. 128, n. 3, p. 379–391, 2001.

WINSLOW, R. M. Oxygen: the poison is in the dose. **Transfusion**, v. 53, n. 2, p. 424–37, fev. 2013.

WINTERBOURN, C. C. The biological chemistry of hydrogen peroxide. **Methods in enzymology**, v. 528, p. 3–25, 2013.

YADAV, N.; YADAV, R.; GOYAL, A. Chemistry of Terpenoids. **international journal of Pharmacological sciences Review, Research**, v. 27, n. 45, p. 272–278, 2014.

YOUDIM, K. A.; DEANS, S. G. Beneficial effects of thyme oil on age-related changes in the phospholipid C20 and C22 polyunsaturated fatty acid composition of various rat tissues. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1438, n. 1, p. 140–146, 1999.

YU, W.; LIU, Q.; ZHU, S. Carvacrol Protects against Acute Myocardial Infarction of Rats via Anti-oxidative and Anti-apoptotic Pathways. **Bio Pharm Bull**, v. 36, n. April, p. 579–584, 2013.

ZHANG, G. et al. Local administration of lactic acid and a low dose of the free radical scavenger, edaravone, alleviates myocardial reperfusion injury in rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 369–78, out. 2013.

ZHANG, H.; CHEN, Y. Plant Terpenes. **Phytochemistry and Pharmacognosy**, p. 9, 2014.

ZHAO, Y.; ZHAO, B. Protective effect of natural antioxidants on heart against ischemia-reperfusion damage. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 11, n. 8, p. 868–74, dez. 2010.

ZHAO, Z. et al. Pre-treatment of a single high-dose of atorvastatin provided cardioprotection in different ischaemia/reperfusion models via activating mitochondrial KATP channel. **European journal of pharmacology**, v. 751, p. 89–98, 15 mar. 2015.